



Rôles des peptides dérivés de la préproghréline dans le contrôle de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire

Rim Hassouna

► To cite this version:

Rim Hassouna. Rôles des peptides dérivés de la préproghréline dans le contrôle de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T045 . tel-00781915

HAL Id: tel-00781915

<https://theses.hal.science/tel-00781915>

Submitted on 28 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES – PARIS 5

Ecole Doctorale Gc2ID

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité Neurosciences

**Rôles des peptides dérivés de la préprogréline dans le
contrôle de la sécrétion de GH et du comportement
alimentaire**

Soutenue publiquement par :

Rim HASSOUNA

Le 27 novembre 2012

Devant le jury composé de :

Pr. Christophe Magnan, Président

Dr. Xavier Bonnefont, Rapporteur

Dr. Nicolas Chartrel, Rapporteur

Dr. Luc Pénicaud, Examineur

Dr. Odile Viltart, Examineur

Dr. Jacques Epelbaum, Directeur de thèse

Dr. Virginie Tolle, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A l'image du générique final d'un film, je souhaite exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance à tous les protagonistes qui ont contribué à cette histoire.

Je remercie vivement tous les membres du jury qui me font l'honneur de juger cette thèse :

M. Xavier Bonnefont et M. Nicolas Chartrel, pour le temps qu'ils ont consacré à examiner et juger ce travail en tant que rapporteurs, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

M. Christophe Magnan pour avoir accepté de présider le jury et pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

M. Luc Pénicaut pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Mme Odile Viltart pour sa présence en tant qu'examineur mais également pour toute son implication et son intérêt pour ce travail et son extrême gentillesse.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été produits au sein du Centre de Psychiatrie et Neurosciences, dans l'équipe intitulée « Neuroendocrinologie de la croissance et de la sénescence » dirigée par M. Jacques Epelbaum.

Je souhaite ainsi vivement remercier Jacques pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et offert l'opportunité de faire cette thèse également pour sa participation à la direction de cette thèse et son constant intérêt pour mon travail.

Je remercie vivement et tout particulièrement Mme. Virginie Tolle pour l'opportunité qu'elle m'a offert d'effectuer ce travail au sein de sa « petite équipe ». Elle a dirigé la réalisation de cette thèse avec toujours beaucoup de patience, de douceur et de passion. Travailler avec elle fut un réel plaisir. Qu'elle trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères ainsi que de mon amitié.

Un grand merci à Philippe Zizzari, sans qui la majorité des expériences *in-vivo* n'auraient pas été possibles. Son expérience a été d'une aide précieuse tout au long de ces trois années. Je lui adresse toute mon amitié. Je pense également à Oriane Fiquet, travailler avec elle fut un réel plaisir, je lui souhaite beaucoup de réussite dans l'avenir.

Je tiens à remercier toute l'équipe, de sa configuration 2009 à 2012. Tous ses membres ont eu un rôle à jouer au cours de cette thèse :

Jacques Pantel pour les discussions scientifiques, les conseils et suggestions et pour tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Catherine Videau et Catherine Loudes pour m'avoir transmis leur savoir et leur technicité notamment pour l'immunohistochimie et les dosages.

Emmanuelle Duron, Dominique Grouselle, Axelle Simon, Guillaume Martel, Emmanuel Moyse et Cécile Viollet, pour nos discussions qu'elles soient scientifiques ou non, pour leur conseils et leur sympathie.

Ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans ses actrices et acteurs principaux: les souris, dont Alice et Chloé ont toujours pris grand soin qu'elles trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance. Je remercie également Julie qui m'a apporté son aide pour l'expérimentation, les journées de prélèvement passaient vite en sa présence.

Enfin je n'oublie pas ma famille et mes amis. Mes parents qui m'ont supporté dans tous les sens du terme et bien sûr Erwan avec lequel j'ai partagé cette expérience. Anne-Claude, Anne-Laure, Blandine, Joyce, Laetitia, Romain, Sandra, Sophie avec lesquels il a toujours été très agréable de sortir dîner, aller au ciné ou tout simplement discuter après une bonne journée au labo !

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Si la pratique et la théorie sont réunies, rien ne fonctionne et on ne sait pas pourquoi.

Albert Einstein.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABRÉVIATIONS	9
AVANT PROPOS	11
INTRODUCTION	12
PARTIE 1 : L'HORMONE DE CROISSANCE (GH)	14
1. Structure et récepteur de la GH	14
2. Fonctions de l'hormone de croissance	15
2.1. Les insulin-like growth factors (IGF).....	16
2.2. Rôle de la GH dans la croissance.....	16
2.3. Rôle de la GH dans la régulation du métabolisme énergétique.....	16
3. Mode de sécrétion de la GH	17
4. Régulation de la sécrétion de GH.....	19
4.1. Régulation par les facteurs centraux	19
4.1.1. Facteurs hypothalamiques	20
4.1.1.1. La somatolibérine : GHRH	20
4.1.1.2. La somatostatine : SRIH	22
4.1.1.3. Interaction entre GHRH et SRIH pour le contrôle de la sécrétion de GH	24
4.1.1.4. Dimorphisme sexuel du mode de sécrétion de GH	25
4.1.1.5. Les autres facteurs hypothalamiques	26
4.1.2. Les neurotransmetteurs hypothalamiques ou extra-hypothalamiques.....	28
4.1.3. Modèles pour l'interaction entre les différents facteurs pour régulation de la sécrétion de GH.....	31
4.2. Les facteurs périphériques	31
4.2.1. L'insulin-like growth factor I: IGF-I	31
4.2.2. Les glucocorticoïdes	32
4.2.3. La leptine et les signaux métaboliques et nutritionnels.....	32
4.2.4. La GH : rétrocontrôle négatif	33
PARTIE 2 : LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.....	35
1. Régulation de l'homéostasie énergétique	35
1.1. Régulation à court terme	35
1.1.1. Les macronutriments.....	36
1.1.2. Les signaux mécaniques	36
1.1.3. Les peptides gastro-intestinaux	36

1.2. Régulation à long terme	40
1.2.1. L'insuline	40
1.2.2. La leptine	40
2. Les différents centres régulateurs du comportement alimentaire.....	41
2.1. Un réseau central pour le contrôle de l'homéostasie énergétique.....	41
2.1.1. L'hypothalamus : organisation des neurones senseurs du statut énergétique.....	41
2.1.1.1. Les neurones orexigènes.....	44
2.1.1.2. Les neurones anorexigènes.....	46
2.1.1.3. Le rôle des neurotransmetteurs	48
2.1.2. Le complexe Vagal Dorsal (CVD)	48
2.2. Le contrôle non homéostatique de la prise alimentaire : le système de récompense	49
PARTIE 3 : LES PEPTIDES DERIVES DE LA PREPROGHRÉLINE	52
1. Structure, formes et synthèse des peptides dérivés de la préproghréline.....	52
1.1. La ghréline	52
1.2. L'obestatine.....	56
2. Fonctions des peptides dérivés de la préproghréline	58
2.1. Action sur la sécrétion de l'hormone de croissance.....	58
2.2. Action sur le contrôle du comportement alimentaire	60
2.3. Action sur le contrôle du métabolisme énergétique	61
2.3.1. Action sur l'homéostasie glucidique	61
2.3.2. Action sur le métabolisme des lipides.....	61
2.4. Autres actions.....	62
2.5. Utilisation de la ghréline en clinique	63
3. Les modèles animaux : révélation des rôles des peptides endogènes dérivés de la préproghréline	64
3.1. Invalidation du GHSR	64
3.2. Invalidation de la GOAT	65
3.3. Invalidation de la ghréline	65
4. Expression et sécrétion des peptides dérivés de la préproghréline	68
4.1. Durant le développement.....	68
4.2. Chez l'adulte.....	68
5. Régulation de la sécrétion des peptides dérivés de la préproghréline	70
5.1. En situation de dénutrition.....	70
5.2. En situation d'excès de la balance énergétique.....	71
6. Polymorphismes du gène de la préproghréline : relation avec des pathologies liées à un déséquilibre de la balance énergétique.....	71
OBJECTIFS	73

Partie I : Interaction au niveau du système nerveux central des peptides dérivés de la préproghréline pour le contrôle de la sécrétion de GH et de la prise alimentaire.	75
Partie II : Rôle de la préproghréline endogène dans le contrôle de la sécrétion de GH et de la prise alimentaire.	84
Partie III : Manipulations pharmacologiques pour l'étude de la signalisation ghréline/GHSR.....	112
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	146
1. L'obestatine une hormone controversée.....	147
2. Impacts des polymorphismes de la préproghréline.....	150
3. Les réponses différentielles à l'administration de ghréline.....	152
4. Rôle de la balance ghréline/obestatine dans le comportement alimentaire et la sécrétion de GH	153
5. Rôle de la ghréline dans la pulsativité de sécrétion de GH	155
6. Choix des modèles de souris KO pour l'étude des rôles des peptides dérivés de la préproghréline	157
BIBLIOGRAPHIE	160
ANNEXES	202
Annexe I: The Ghrelin/Obestatin Balance in the Physiological and Pathological Control of Growth Hormone Secretion, Body Composition and Food Intake.....	203
Annexe II: Meal Anticipatory Rise in Acylated Ghrelin at Dark Onset is Blunted After Long-Term Fasting in Rats	204
Annexe III: Physiological roles of preproghrelin-derived peptides in GH secretion and feeding	205

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 :	Page 13
Représentations des structures de la GH et de l'activation de son récepteur le GH-R	
Figure 2 :	Page 15
Principaux effets biologiques de la GH	
Figure 3 :	Page 18
Profils de sécrétion de GH sur 24h chez le rat et l'homme	
Figure 4 :	Page 20
Régulation de la sécrétion de GH par les peptides hypothalamiques	
Figure 5 :	Page 24
Représentation schématique des mécanismes de transduction des signaux issus des récepteurs à la GHRH et SRIH au niveau des cellules somatotropes	
Figure 6 :	Page 35
Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie énergétique	
Figure 7 :	Page 43
Schéma représentant l'organisation des neurones impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire	
Figure 8 :	Page 49
Représentation schématique du complexe vagal dorsal (CVD)	
Figure 9 :	Page 51
Modèle d'intégration des signaux liés à la récompense et des signaux liés à l'adiposité	
Figure 10 :	Page 52
Schéma représentatif de la structure de la préproghréline et de ses peptides dérivés	
Figure 11 :	Page 54
Représentation de l'activation du GHS-R 1a et de ses voies de signalisation	
Figure 12 :	Page 57
Fonctions pléiotropes des peptides dérivés de la préproghréline	
Figure 13 :	Page 59
Représentation schématique de l'implication de la ghreline dans le contrôle de la sécrétion de GH	
Figure 14 :	Page 69
Profils de sécrétion pulsatile de ghreline	

Figure 15 :	Page 72
Les polymorphismes du gène de la préproghréline et leur implication dans des pathologies liées à un déséquilibre de la balance énergétique	
Figure 16 :	Page 78
Quantification du nombre de neurones à NPY et GHRH au niveau du noyau arqué	
Figure 17 :	Page 105
Contenus de l'estomac et concentration plasmatique de ghréline acylée (AG) et non acylée (DAG) et ratio AG/DAG chez les souris ghrl+/+ et ghrl+/-	
Figure 18 :	Page 107
Profils de sécrétion de GH représentatifs chez les souris ghrl+/+ et ghrl+/- âgées de 7 et 36 semaines	
Figure 19 :	Page 108
Analyse Cluster des paramètres de pulsatilité de la sécrétion de GH chez les souris ghrl+/+ et ghrl+/- âgées de 7 et 36 semaines	
Figure 20 :	Page 109
Quantité d'obestatine au niveau de l'estomac et concentrations plasmatiques chez les souris ghrl+/+ et ghrl-/-	
Figure 21 :	Page 110
Prise alimentaire et activité spontanée chez les souris ghrl+/+ et -/- âgées de 12 semaines	
Figure 22:	Page 138
Sécrétion de GH suite à l'administration de composés BIM chez la souris ghrl-/-	
Figure 23:	Page 139
Prise alimentaire cumulée suite à l'administration de composés BIM chez la souris ghrl-/-	
Figure 24:	Page 140
Sécrétion de GH suite à la co-administration d'obestatine et de ghréline chez la souris ghrl-/-	
Figure 25:	Page 142
Prise alimentaire cumulée suite à la co-administration d'obestatine et de ghréline chez la souris ghrl-/-	
Figure 26:	Page 148
Prise alimentaire cumulée suite à l'administration de ghréline ou obestatine seule chez les souris ghrl+/+ et ghrl-/-	
Figure 27:	Page 153
Analyse de corrélation entre la prise alimentaire 14 minutes avant l'injection de ghréline et la réponse à la ghréline	
Figure 28 :	Page 154
Impact de la nutrition sur la balance ghréline/obestatine chez l'homme	

Tableau 1 :	Page 30
Principaux facteurs centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH	
Tableau 2 :	Page 55
Localisation de l'expression du GHS-R1a et fonctions associées	
Tableau 3:	Page 67
Comparaison entre les différents modèles de souris KO pour l'étude de la signalisation ghréline/GHS-R1a	

ABRÉVIATIONS

5-HT: sérotonine

α -MSH : Melanocyte Stimulating Hormone (Hormone mélanotrope)

Ach : acétylcholine

ACTH : AdrenoCorticoTropin Hormone (hormone corticotrope)

AgRP : Agouti-related peptide (Protéine apparentée à la protéine agouti)

AMPC: Adénosine Monophosphate Cyclique

AP : Area Postrema

APT1: Acyl-Protéine Thioesterase 1

ARC: Noyau Arqué de l'hypothalamus

AVP : Arginine Vasopressin (vasopressine)

CCK: Cholécystokinine

CLIP: Corticotropin Like Intermediate lobe Peptide (peptide de la famille des corticotropes du lobe intermédiaire)

CRH : Corticotropin Releasing Hormone (corticolibérine)

CVD : Complexe Vagal Dorsal

DMH : noyau Dorso-Médian Hypothalamique

DMV: noyau Dorso Moteur du Vague

GABA : Acide γ aminobutyrique

GH: Growth Hormone (hormone de croissance)

GHBP: Growth Hormone Binding Protein (Protéine de liaison à l'hormone de croissance)

GHRH: Growth Hormone Releasing Hormone (Somatolibérine)

GHS-R: Growth Hormone Secretagogue Receptor (Récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance)

GIP: Glucose-dependant Insulinotropic Peptide (peptide insulino-trope dépendant du glucose)

GLP-1: Glucagon-like peptide 1 (peptide de la famille du glucagon)

i.c.v. intracérébroventriculaire

i.p.: intrapéritonéale

i.v.: intraveineuse

IGF-1: Insulin-like growth factor 1 (Somatomédine)

JAK: Janus Kinase

LHA : Lateral Hypothalamic Area (Aire Hypothalamique Latérale)

MCH : Melanin Concentrating Hormone (Hormone de concentration de la mélanine)

MC-3 et 4R : Melanocortin Receptor 3 and 4 (Récepteur aux mélanocortines 3 et 4)

MPOA: Medial Preoptic Area (Aire pré-optique médiane)

NPY : Neuropeptide Y

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (peptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire)

PeV: Noyau Périventriculaire

PKA: Protéine Kinase A

PKC: Protéine Kinase C

POMC : Proopiomélanocortine

PRL: prolactine

PVN: Noyau Paraventriculaire

PYY: Peptide tyrosine-tyrosine

SRIH: Somatotropin Releasing Inhibiting Hormone (Somatostatine)

TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone (Thyréolibérine)

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide (peptide vasoactif intestinal)

VMH : noyau Ventro-Médian de l'Hypothalamus

VTa: Ventral-Tegmental Area (aire ventrale tégmentale)

AVANT PROPOS

L'isolation de la ghréline en tant que ligand endogène du récepteur des GH sécrétagogues, substances synthétiques capables de stimuler la sécrétion d'hormone de croissance (GH), a permis l'ouverture de perspectives pour le développement de nouveaux traitements des pathologies en lien avec des déficits en GH. Au delà de son rôle de puissant stimulateur de la GH, la ghréline est la seule hormone orexigène du tractus gastro-intestinal et qui possède également un fort pouvoir adipogène. La ghréline apparaît ainsi comme ayant un rôle clé dans la régulation de fonctions essentielles à la vie.

En effet, le maintien de l'homéostasie énergétique est indispensable tout au long de la vie et la GH participe à cet équilibre en plus d'assurer la croissance à proprement parler. Diverses pathologies sont associées à un déséquilibre de la balance énergétique et/ou de la sécrétion de GH telles que l'obésité ou l'anorexie mentale. L'obésité et les troubles du comportement alimentaire représentent des enjeux de santé publique majeurs en particulier dans nos sociétés occidentales. Ainsi, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la régulation de ces deux paramètres qui sont très liés semble nécessaire dans le contexte dans lequel nous vivons.

Un peptide issu du même précurseur que la ghréline a été identifié plus récemment : l'obestatine. L'obestatine apparaît jouer un rôle de modulateur des effets de la ghréline sur la régulation de la sécrétion de GH et le comportement alimentaire. Cependant les mécanismes et les modalités mis en jeu pour cette interaction ne sont pas élucidés.

Pour ce travail nous nous sommes intéressés à l'action de différents peptides dérivés de la préproghréline : la ghréline et l'obestatine pour la régulation de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire.

INTRODUCTION

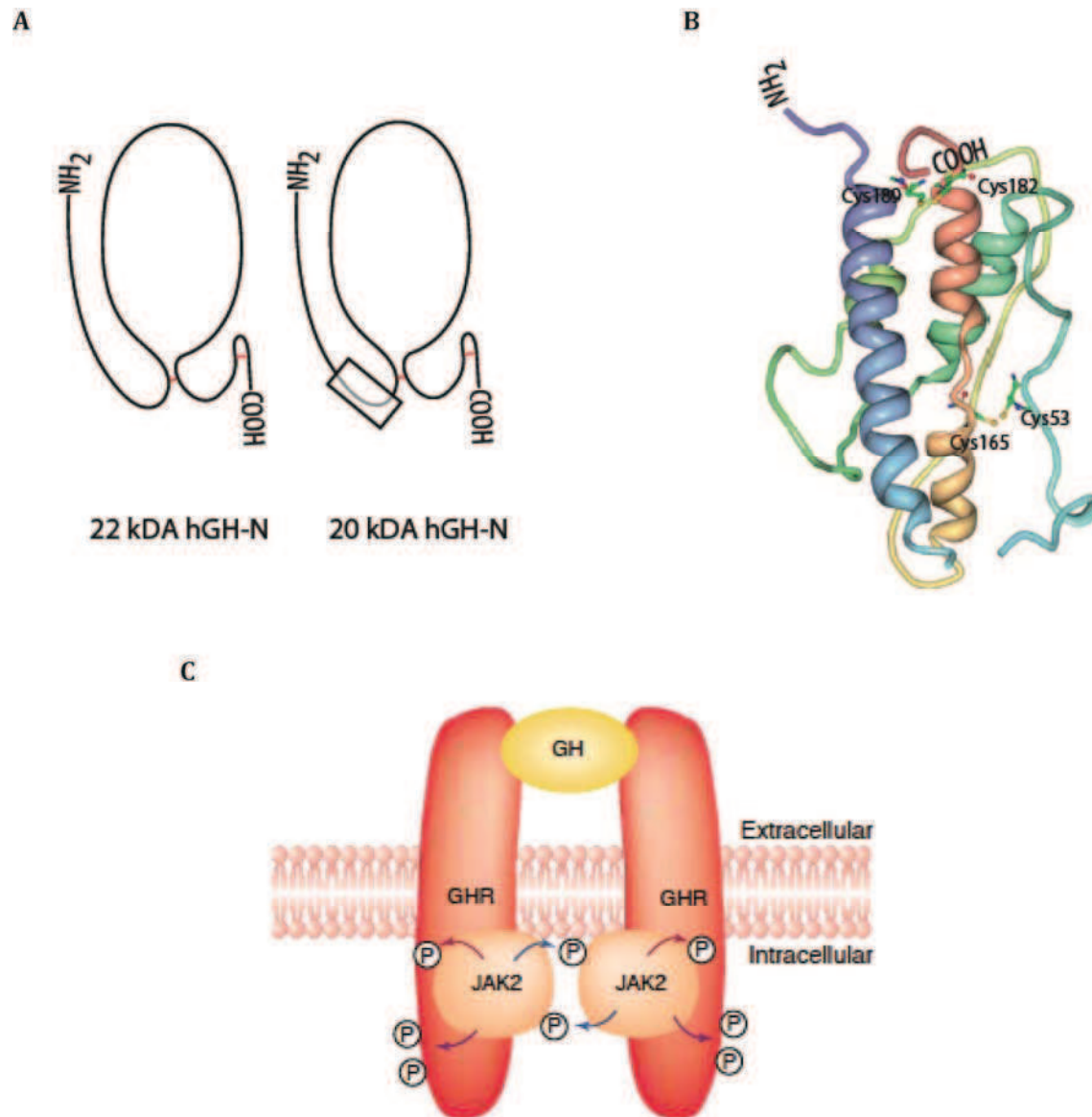


Figure 1 : Représentations des structures de la GH et de l'activation de son récepteur le GH-R.

- A. Représentation Schématique de la structure des deux isoformes de GH de 22 et 20kDa. Le rectangle représente la région de délétion des 15 acides aminés menant à la forme de 20kDa.
- B. Représentation tridimensionnelle de la structure de la GH.
- C. Représentation schématique de la dimérisation de deux GH-R faisant suite à la liaison de la GH et conduisant au recrutement de JAK2 qui se phosphorylent l'une l'autre (flèches bleues) et s'activent puis s'autophosphorylent (flèches rouge) et enfin phosphorylent le domaine cytoplasmique des GH-R (flèches violettes).

D'après thèse de Zizzari P. et (Herrington and Carter-Su 2001)

Partie 1 : L'hormone de croissance (GH)

1. Structure et récepteur de la GH

Dès les années 1920 les études d'Evans et Long ont montré que l'administration d'extraits hypophysaires induisait le gigantisme chez le rat (Evans and Long 1922) mais ce n'est qu'en 1944 que l'hormone de croissance est isolée à partir d'hypophyses bovines (Li and Evans 1944). La GH est un polypeptide qui appartient à la même famille que la prolactine et l'hormone lactogène placentaire. Le gène de la GH humaine fait partie d'un cluster composé de cinq gènes structurellement proches. Il est exprimé dans l'hypophyse et après épissage alternatif mène à la production de deux isoformes (DeNoto et al 1981 , Lewis et al 1980): l'une de 22kDa, composée de 190 acides aminés chez le rat et 191 acides aminés chez l'homme, qui est majoritaire (85% de la GH circulante) et l'autre de 20kDa composée de 176 acides aminés (Kopchick and Andry 2000 , Zhan et al 2005). (Figure 1A et B)

La GH est sécrétée par l'hypophyse antérieure directement dans la circulation générale et agit au niveau de ses tissus cibles par le biais de son récepteur. Le récepteur de la GH (GH-R) a été cloné en 1987 (Leung et al 1987). La protéine est constituée de 638 acides aminés et possède une structure avec un seul domaine transmembranaire. Le GH-R appartient à la superfamille des récepteurs à cytokines qui inclut plus de 25 membres dont les récepteurs à la prolactine, à la leptine ou encore aux interleukines (Smith et al 1999).

Une molécule de GH se lie au domaine extracellulaire du GH-R ce qui conduit à la dimérisation de ce GH-R avec un deuxième GH-R (Wells 1996). Cette étape de dimérisation est importante pour la transduction du signal GH. En réponse de la liaison de la GH, 2 molécules JAK2 (Janus Kinase) sont recrutées par les 2 GH-R (Argetsinger et al 1993). Elles se phosphorylent l'une l'autre puis s'autophosphorylent pour enfin phosphoryler le domaine cytoplasmique du GH-R sur les résidus tyrosine (Behncken et al 2000) JAK2 phosphorylée permet le recrutement de différentes molécules de signalisation dont les molécules de la famille des signaux de transduction et activateurs de la transcription (STAT) (Herrington et al 2000) (Figure 1C).

Des protéines de liaison de la GH (GHBP), présentent dans la circulation générale, régulent l'accès de la GH circulante au GH-R. Six protéines de liaison ont été caractérisées (GHBP 1 à 6). Les GHBP sont majoritairement produites par le foie par épissage alternatif du gène du GH-R chez le rongeur (Baumbach et al 1989 , Edens et al 1994) et par clivage protéolytique du GH-R chez l'homme ou le lapin (Baumann et al 1986 , Spencer et al 1988). Ces protéines modulent la quantité de GH disponible au niveau de ses tissus cibles en formant des hétérodimères avec le GH-R empêchant sa signalisation (Mannor et al 1991) ou encore augmentant la demi-vie de la GH (Tzanela et al 1997).

2. Fonctions de l'hormone de croissance

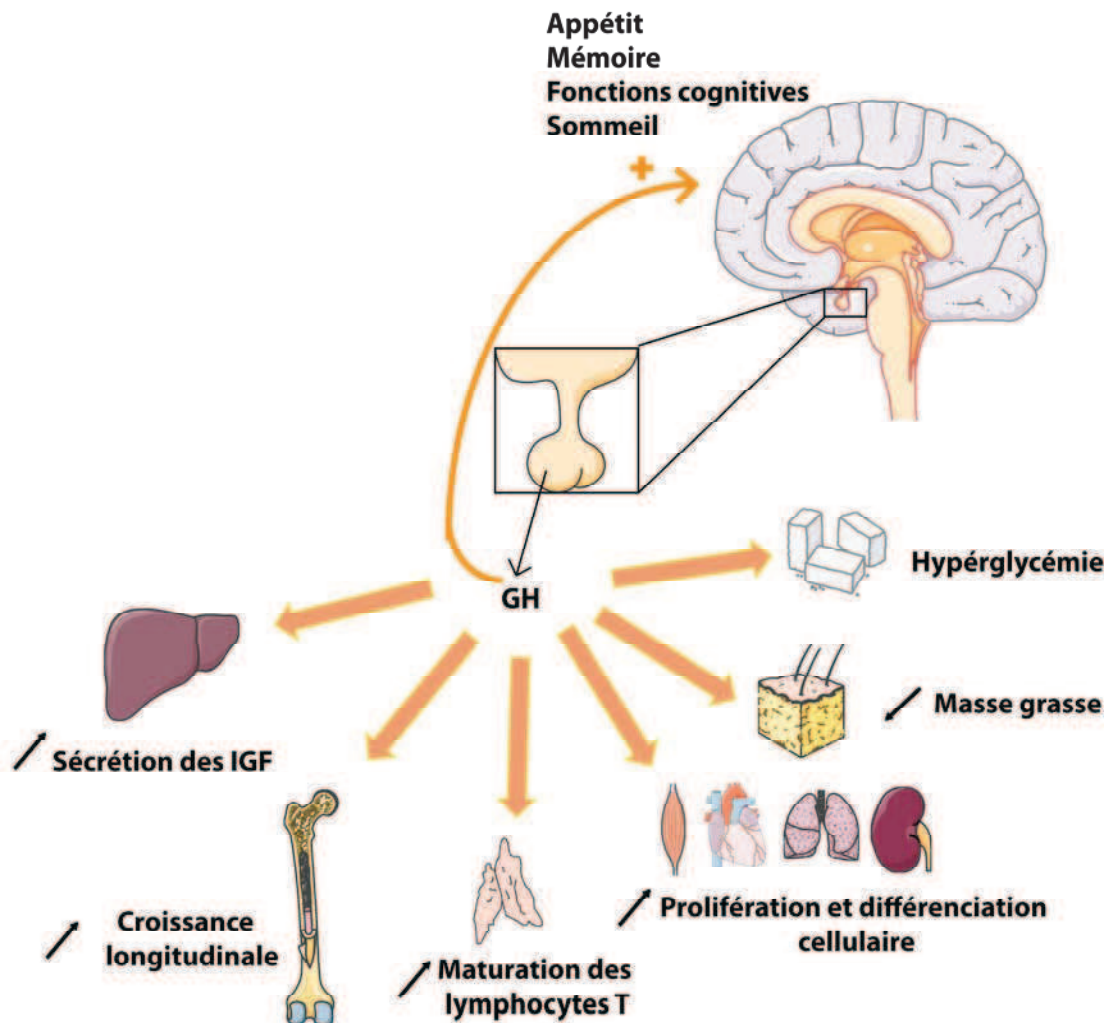


Figure 2: Principaux effets biologiques de la GH.

Le GH-R est largement distribué au sein de l'organisme que ce soit au sein du système nerveux central (Burton et al 1992) ou en périphérie où il est exprimé dans de nombreux organes mais principalement au niveau du foie (Lobie et al 1990, Waters et al 1990). La GH a de nombreuses actions. Elle stimule la prolifération et la différenciation cellulaire au niveau de plusieurs organes tels que le muscle, le cœur, les poumons ou encore le rein ; elle participe à l'immunité en stimulant la maturation des lymphocytes T ; elle est également impliquée dans la modulation de l'appétit, de la mémoire, des fonctions cognitives et du sommeil au niveau central. Les deux principales fonctions de la GH étant la régulation de la croissance et du métabolisme énergétique (Figure 2). Elle agit directement au niveau de ses tissus cibles par l'intermédiaire du GH-R mais aussi indirectement en

stimulant les somatomédines ou encore insulin-like growth factors (IGF) notamment l'IGF-1 au niveau du foie.

2.1. Les insulin-like growth factors (IGF)

Les IGF sont principalement synthétisés par le foie ainsi que par beaucoup d'autres tissus de l'organisme, comme le muscle lisse, la peau, les poumons, les os ou encore les cartilages, et participent à la croissance et la fonction de beaucoup d'organes (Daughaday and Rotwein 1989). L'IGF-1 et 2 ont des similarités de structure avec l'insuline et sont toutes deux essentielles pour le développement fœtal (Baker et al 1993) bien qu'après la naissance seule l'IGF-1 soit nécessaire pour la croissance (Le Roith 1997). L'âge, le sexe, le statut nutritionnel ainsi que la GH affectent les concentrations circulantes d'IGF-1. Les concentrations plasmatiques d'IGF-1 sont faibles à la naissance, augmentent au cours de l'enfance et de la puberté pour ensuite commencer à décroître autour de la trentaine (Le Roith et al 1997). En ce qui concerne le statut nutritionnel, le jeûne provoque une forte diminution des taux d'IGF-1 ainsi qu'une résistance à la GH (Isley et al 1983). Chez le rat ayant subi une hypophysectomie, la GH administrée centralement ou en périphérie permet la restauration de l'expression d'IGF-1 (Ye et al 1997). L'IGF-1 joue un rôle majeur dans le développement du système nerveux central chez l'homme (Woods et al 1997) et en plus de ses actions en faveur de la croissance, la différenciation et la prolifération au niveau de différents tissus, elle promeut également la survie des cellules progénitrices des neurones et de la glie (D'Ercole et al 2002, Ye et al 1997).

2.2. Rôle de la GH dans la croissance

La GH est considérée comme ayant un rôle central dans la régulation endocrine de la croissance. La croissance dépendante de la GH se met en place en période post-natale alors que la croissance fœtale est indépendante de la GH (Okada and Kopchick 2001). L'hyposécrétion de GH durant les premières années de développement entraîne un nanisme et par opposition, l'hypersécrétion de GH avant la puberté mène à un gigantisme (Cheek et al 1974). La GH agit directement au niveau des os pour promouvoir la différenciation de précurseurs cellulaires, les pré-chondrocytes, et stimule la synthèse d'IGF-1 qui à son tour stimule la prolifération des chondrocytes du cartilage de conjugaison (Isaksson et al 1982). Ainsi la GH et l'IGF-1 participe de façon synergique à la croissance staturo-pondérale. La GH favorise également la croissance longitudinale des os (Isaksson et al 1987).

La GH a également un rôle dans la prolifération et la différenciation de nombreux tissus comme le rein, le cœur, les poumons ou les muscles squelettiques (Green et al 1985).

2.3. Rôle de la GH dans la régulation du métabolisme énergétique

Le tissu adipeux est une autre des cibles de la GH (Casanueva 1992), elle a un impact sur la formation et le métabolisme des adipocytes. La GH a un effet lipolytique, elle réduit la masse grasse en stimulant l'hydrolyse des triglycérides, la libération d'acides gras libres et de glycérol. Au niveau du muscle, la GH stimule la capture des acides aminés et la rétention de

nitrogène (Casanueva 1992). Ainsi la GH promeut des changements dans la composition corporelle qui ont notamment été étudiés chez les patients atteints d'acromégalie. Ces derniers ont une plus grande proportion de masse maigre en comparaison avec des sujets sains (O'Sullivan et al 1994).

La GH a également pour effet la réduction de l'oxydation des protéines (Horber et al 1991) et la stimulation de leur synthèse (Horber and Haymond 1990). Ainsi ce sont probablement les effets contre l'oxydation des protéines associés à la stimulation de la synthèse des protéines qui entraînent une augmentation de la masse maigre au détriment de la masse grasse après un traitement à la GH.

La GH a de plus une action sur le métabolisme des sucres. Elle a pour effet une réduction de l'oxydation du glucose (Moller et al 1990) et exerce ainsi une action hyperglycémisante.

3. Mode de sécrétion de la GH

La sécrétion de GH depuis l'hypophyse antérieure vers la circulation générale est pulsatile chez toutes les espèces étudiées jusqu'à ce jour. Le rythme ultradien de sécrétion de GH varie en fonction de l'espèce et du sexe (Figure 3). D'une manière générale, la sécrétion de GH est biphasique avec une alternance de pics sécrétoires et de valeurs basales et une période entre les pics d'environ 2h chez l'homme (Winer et al 1990) et 3h (Tannenbaum and Martin 1976) chez le rat. Chez l'homme, un pic très reproductible de plus grande amplitude se produit dans les premières heures de la nuit en relation avec le sommeil à ondes lentes (SWS) (Jaffe et al 1998, Pringle et al 1992). Chez le rat femelle, bien que le taux global de GH soit identique à celui du mâle, l'amplitude des pics est plus faible, les valeurs basales sont plus élevées et les pics plus fréquents et moins réguliers (Clark et al 1987, Eden 1979, Jaffe et al 1998, Winer et al 1990). Chez la souris, le mode et le rythme de sécrétion de l'hormone de croissance sont plus difficiles à mettre en évidence du fait de la difficulté d'effectuer des prélèvements sanguins itératifs et du faible volume de ces prélèvements. Cependant quelques équipes ont publié des données, obtenues soit grâce à la mise en place de canules intracardiaques soit par la méthode d'analyse « rank plot » sur un large groupe d'animaux, qui laissent envisager un mode de sécrétion pulsatile de la GH dans cette espèce (MacLeod et al 1991). Plus récemment Steyn et collaborateurs ont publié une méthode de prélèvements sanguins non invasifs et répétés chez la souris accompagnée d'un dosage immuno-enzymatique (EIA) très sensible ce faisant sur sang total (Steyn et al 2011). Ces derniers développements, qui seront discutés dans la partie II des résultats, permettront une meilleure compréhension du mode de sécrétion et de régulation de la GH chez la souris.

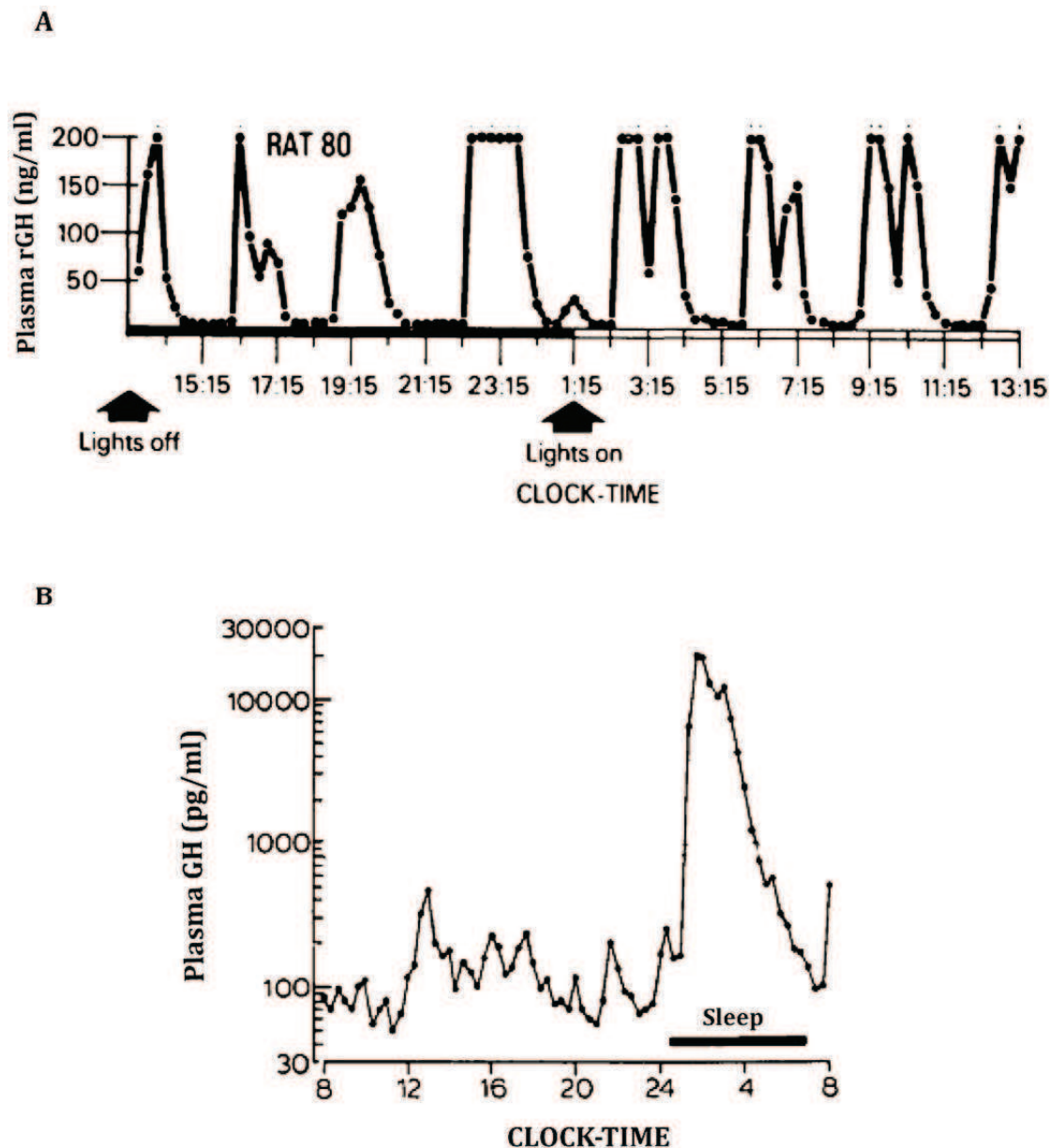


Figure 3 : Profils de sécrétion de GH de 24h chez le rat et l'homme

- A. Profil de sécrétion spontanée de GH sur 24h chez le rat mâle adulte (d'après Tannenbaum et al 1976).
- B. Profil de sécrétion spontanée de GH sur 24h chez l'homme adulte (d'après Winer et al 1990).

Le mode de sécrétion de GH est important pour beaucoup de fonctions de l'hormone. Chez l'homme, les concentrations en IGF-1 sont positivement corrélées avec la sécrétion pulsatile de GH (Veldhuis et al 1995) et chez le rat ayant subi une hypophysectomie, les injections de GH réalisées de façon répétées sont plus efficaces pour la stimulation de la croissance et la synthèse d'IGF-1 que la même quantité de GH injectée en une seule fois (Clark and Robinson 1985 , Isgaard et al 1988 , Maiter et al 1988).

Le schéma de sécrétion sur 24h de la GH change au cours de la croissance et du vieillissement. Les concentrations plasmatiques en GH sont plus élevées chez le fœtus qu'en période post-natale dans de nombreuses espèces incluant l'homme (Gluckman et al 1992). Chez le rat, une augmentation des concentrations plasmatiques de GH est observée immédiatement avant la naissance et une diminution à environ 20 jours après la naissance (Walker et al 1977). Le changement dans la concentration plasmatique de GH au moment de la puberté est sexe dépendant : l'augmentation se produit plus tôt chez la fille que chez le garçon (Tanner and Whitehouse 1976), les stéroïdes sexuels exercent alors un rôle plus important dans la régulation de la sécrétion de GH. Lors du vieillissement, la sécrétion de GH diminue chez les mammifères (Müller et al 1995). Chez le rat, indépendamment du sexe, la sécrétion moyenne de GH diminue avec l'âge sans affecter la fréquence des pics (Sonntag et al 1980). Chez l'homme, à partir de 20 ans, une diminution de 10 à 20% de l'amplitude des pics sécrétoires de GH est également observée tous les 10 ans.

4. Régulation de la sécrétion de GH

4.1. Régulation par les facteurs centraux

La sécrétion de GH est régulée par un système neuroendocrinien complexe dont les acteurs principaux sont des neuropeptides hypothalamiques : la somatolibérine (GHRH) et la somatostatine (SRIH) exerçant respectivement un rôle stimulateur et inhibiteur (Figure 4). Ces deux neuropeptides sont eux-mêmes sujet à modulation par d'autres neuropeptides et neurotransmetteurs hypothalamiques et/ou extra-hypothalamiques. (Tableau 1)

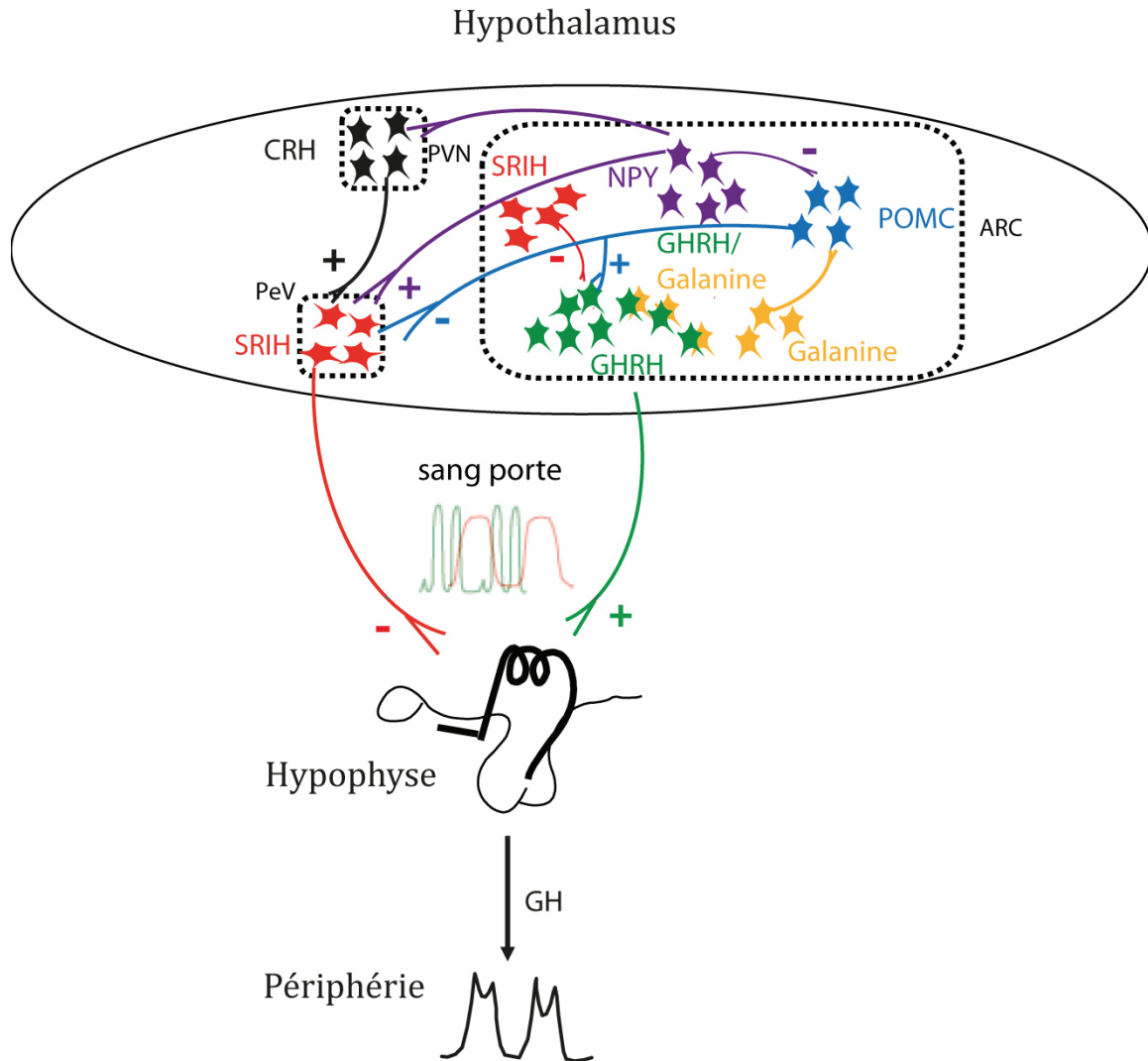


Figure 4 : Régulation de la sécrétion de GH par les neuropeptides hypothalamiques

Les neurones qui co-expriment la GHRH et la galanine sont représentés par une superposition de neurones verts et oranges. ARC : noyau arqué, PeV : noyau périventriculaire, PVN : noyau paraventriculaire.

4.1.1. Facteurs hypothalamiques

4.1.1.1. La somatolibérine : GHRH

La GHRH a été isolée dès la fin des années 1970 (Saeed uz Zafar et al 1979) mais séquencée seulement quelques années plus tard (Guillemin et al 1982) à partir non pas de tissus d'origine animale mais à partir d'une tumeur des îlots pancréatiques d'un patient acromégale, dont la sécrétion ectopique était associée avec une hypersécrétion de GH. Chez l'homme au niveau de l'hypothalamus, 2 formes du peptide ont été séquencées, GHRH (1-44) et GHRH (1-40), différant uniquement de 4 acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale (Lin et al 1984, Ling et al 1984). Le peptide de 44 acides aminés, amidé au niveau

de sa partie C-terminale a été retrouvé au sein d'autres espèces comme le cochon, la chèvre, ou le mouton et est présumé comme étant le peptide mature (Ling et al 1984). Chez le rat, la structure de la GHRH est différente (notamment sur 14 acides aminés qui sont substitués ou supprimés). Le peptide est composé de 43 acides aminés avec un groupement acide libre au niveau de son extrémité C-terminale (Spiess et al 1983). La GHRH appartient à une famille qui inclut des peptides tels que le glucagon-like peptide 1 (GLP-1), le vasoactive intestinal polypeptide (VIP), la secretin, le gastric inhibitory peptide (GIP) ou encore le pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) (Campbell et al 1991).

Deux types de neurone à GHRH existent, le premier projette vers la zone externe de l'éminence médiane depuis le noyau arqué et participe à la fonction hypophysiotrope, le deuxième projette vers les noyaux paraventriculaire, périventriculaire et dorsomédian (Sawchenko et al 1985) et semblent impliqués dans la régulation de la vigilance (Zhang et al 1999). L'immunoréactivité GHRH est présente majoritairement au niveau de l'hypothalamus basal, ce qui est concordant avec une libération de GHRH vers le système porte hypothalamo-hypophysaire. De légères différences dans la distribution de la GHRH existent entre les espèces. Chez l'homme, les neurones à GHRH sont retrouvés dans le noyau ARC avec des fibres projetant vers l'éminence médiane et dans le noyau ventro-médian (Bloch et al 1984). Chez le rat, la GHRH est présente dans l'ARC, l'hypothalamus baso-latéral, le noyau paraventriculaire, dorsomédian et les parties latérales du ventromédian (Balthasar et al 2003).

Le gène du récepteur de la GHRH (GHRH-R) a été cloné dans différentes espèces (l'homme, le rat et la souris), c'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires, caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G, et constitué de 423 acides aminés (Gaylinn et al 1993, Lin et al 1992, Mayo 1992). Le GHRH-R est majoritairement présent au sein de l'hypophyse et co-localise avec les cellules somatotropes (Lin et al 1992). Ce récepteur est faiblement exprimé au niveau central dans les noyaux périventriculaire, arqué et ventromédian de l'hypothalamus (Takahashi et al 1995).

La Liaison de la GHRH à son récepteur a pour conséquence une augmentation de l'AMPc et du calcium intracellulaire (Bilezikjian and Vale 1983, Brazeau et al 1982), qui conduit à l'exocytose des granules de sécrétion contenant la GH, à l'activation de facteurs de transcription tel que Pit-1 (pituitary-specific transcription factor-1) qui stimule la transcription du gène de la GH (Mayo et al 1995), et à la stimulation de la prolifération des cellules somatotropes (Billestrup et al 1986). (Figure 5)

In vivo, la GHRH stimule la sécrétion de GH chez les rats conscients ou sous anesthésie mais également chez les rats ayant subi une destruction du noyau arqué (Wehrenberg et al 1982). La GHRH est indispensable pour la pulsativité de la sécrétion de GH. L'administration d'un anticorps anti-GHRH en période néonatal chez le rat ralentit la croissance (Wehrenberg et al 1984), provoque des défauts de fonction des cellules somatotropes (Cella et al 1990), et abolit complètement la libération spontanée de GH (Wehrenberg et al 1982).

4.1.1.2. La somatostatine : SRIH

Dès 1968, Krulich et collaborateurs avaient observé une inhibition de la sécrétion de GH par des préparations hypothalamiques ovines brutes (Krulich et al 1968). Cependant l'isolation et l'identification de la SRIH n'ont été réalisées que quelques années plus tard à partir d'hypothalamus ovins (Brazeau et al 1973). Chez les vertébrés, deux formes biologiquement actives de somatostatine ont été identifiées : un peptide de 14 acides aminés (SRIH 14) et un peptide de 28 acides aminés (SRIH 28). Ces deux formes sont issues du clivage protéolytique d'un précurseur commun, la préprosomatostatine composé de 113 à 116 acides aminés selon l'espèce (Pradayrol et al 1980), (Gomez et al 1983, Goodman et al 1983). Un autre peptide présentant une forte homologie avec la somatostatine fut découvert plus tardivement : la cortistatine. Le nom de ce peptide fait référence à sa localisation au niveau des neurones corticaux (de Lecea et al 1996).

La SRIH est largement distribuée au sein du système nerveux central, (Brownstein et al 1975, Pelletier et al 1975) et en périphérie au sein du tractus digestif ou du pancréas (Arimura et al 1975, Leclerc et al 1976). Au niveau de l'hypothalamus, la majorité des neurones à SRIH sont localisés dans le noyau périventriculaire et 78% de ces neurones projettent vers la zone externe de l'éminence médiane (Kawano and Daikoku 1988) mais il existe également des neurones à SRIH à projections plus courtes dans les noyaux arqués, ventromédian et dorsomédian (Epelbaum 1986, Finley et al 1981, Liposits et al 1988).

Dès 1992, les structures d'ADN codant les 5 récepteurs de la SRIH (SST 1 à 5) sont clonés (Patel et al 1995, Reisine and Bell 1995), ce sont tous des récepteurs couplés aux protéines G possédant 7 domaines transmembranaires. Seul le gène du sst2 peut par épissage alternatif amener à la production de deux sous-types de récepteurs, le SST2A et le SST2B, qui diffèrent par la taille de leur extrémité C-terminale (Schindler et al 1998, Vanetti et al 1992). Au sein d'une même espèce on retrouve entre 39 et 57% d'identité de séquence entre les différents sous-types et pour un sous-type donné, une identité de séquence supérieure à 90% entre les espèces (Patel 1997).

L'activation des SST conduit à une réduction de l'AMPc et de la concentration de calcium intracellulaire ainsi qu'à une stimulation des protéines à tyrosine phosphatases (Epelbaum 1992, Patel et al 1995). (Figure 5)

L'expression des messagers des différents sous-types de récepteurs est largement distribuée au sein du système nerveux central et de l'hypophyse. Au sein de l'hypophyse antérieure, les sous-types SST1, SST2, SST3 et SST5 sont exprimés (Day et al 1995, O'Carroll and Krempels 1995, Patel 1997). Une étude utilisant des agonistes a montré l'implication des récepteurs SST2 et SST5 dans l'action inhibitrice de la SRIH sur la sécrétion de GH (Parmar et al 1999). Au niveau de l'hypothalamus, les 5 sous-types de récepteurs sont également exprimés avec une prédominance pour SST1, SST2 et SST3 (Dournaud et al 1996, Schindler et al 1996, Senaris et al 1994). De plus 15 à 20% des neurones à GHRH du noyau arqué expriment les messagers des récepteurs SST1 et SST2 (Beaudet et al 1995, Bertherat et al 1992) et l'expression du messenger du SST1 est positivement influencée par la GH (Guo

et al 1996). Toutes ces dernières données sont concordantes avec un rôle de ces sous-types de récepteurs dans la régulation de la sécrétion de GH.

La SRIH a été initialement décrite comme inhibant la sécrétion spontanée de GH à partir de cellules hypophysaires provenant d'un patient souffrant d'acromégalie et à partir de cellules adéno-hypophysaires de rat (Brazeau et al 1973). L'action inhibitrice de la SRIH sur la sécrétion de GH a été démontrée chez beaucoup d'espèces incluant l'homme et le rongeur. In vivo, le SRIH inhibe la sécrétion de GH provoquée par l'exercice, l'hypoglycémie et le sommeil, et diminue les niveaux de GH chez les patients atteints de diabète ou d'acromégalie (Bratusch-Marrain and Waldhausl 1979, Brazeau et al 1973, Di Luigi et al 1997, Masuda et al 1990, Müller 1987). Cependant la SRIH n'interfère pas avec la synthèse, la transcription, ou la prolifération des cellules hypophysaires somatotrope (Barinaga et al 1985, Billestrup et al 1987, Fukata et al 1985, Tanner et al 1990), son retrait entraîne une augmentation de la sécrétion de GH tant in vitro qu'in vivo (Kraicer et al 1986, Miki et al 1988). En effet, chez les souris déficientes en somatostatine, une augmentation des valeurs basales et moyennes de GH plasmatique est observée (Low et al 2001). Chez le rat, l'injection aiguë d'anticorps anti-SRIH n'entraîne pas d'altération de la sécrétion pulsatile de GH malgré une augmentation des valeurs basales de GH (Ferland et al 1976). Cependant, lorsque l'anti-SRIH est infusé 6h durant chez le mouton, une inhibition de la sécrétion pulsatile de GH est observée (Frohman et al 1990). Ces derniers résultats suggèrent l'implication d'une interaction entre SRIH et GHRH au sein de l'hypothalamus pour la régulation de la pulsativité de GH. Enfin, la GH exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre sécrétion via son récepteur le GH-R se trouvant sur les neurones à SRIH du noyau périventriculaire de l'hypothalamus (Burton et al 1992). Ce rétrocontrôle conduit à la libération de SRIH et par conséquent à une diminution de la sécrétion hypophysaire de GH (Chihara et al 1981).

L'isolation des récepteurs de la somatostatine a permis le développement d'analogues de la somatostatine ayant une action plus puissante notamment sur l'inhibition de la sécrétion de GH. Ces composés comme l'octréotide ou le lanréotide, sont ainsi utilisés en clinique pour le traitement des tumeurs neuroendocrine, ou encore l'acromégalie (Melen-Mucha et al 2006). Ainsi, l'octréotide ou le lanréotide normalisent les taux circulants de GH et IGF-1 chez environ 60 à 70% des patients atteints d'acromégalie (Hofland et al 2005).

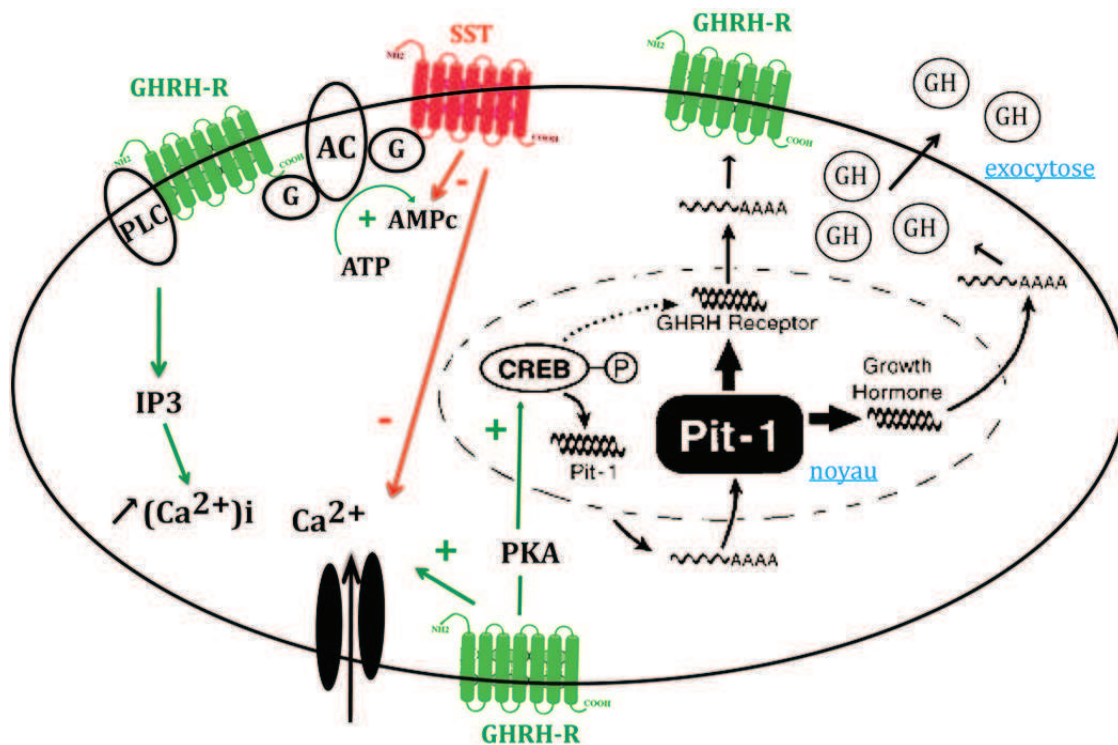


Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de transduction des signaux issus des récepteurs à la GHRH et SRIH au niveau de la cellule somatotrope. (D'après Müller et al 1999)

La SRIH, en se liant à ses récepteurs SST conduit à la diminution des concentrations intracellulaires en AMPc et en calcium, induisant ainsi une action inhibitrice sur la sécrétion de la GH dans la cellule somatotrope. La GHRH, en se liant à son récepteur, active la voie de l'adénylate cyclase (Ac) et la formation d'AMPc qui via la PKA (protéine kinase A) favorise l'entrée de calcium dans la cellule et induit l'exocytose des vésicules de GH. Parallèlement, la GHRH active la voie de la PLC (phospholipase C) qui par le biais de l'IP3 mobilise les stocks intracellulaires de calcium. Au niveau nucléaire, la GHRH active CREB (camp responsive élément binding protein) qui une fois phosphorylé induit la transcription de gènes cibles dont celui de la GH, du GHRH-R et du facteur de transcription Pit-1 qui à son tour permet la transcription du gène de la GH. En revanche, la SRIH n'intervient pas dans la régulation de la synthèse de la GH.

4.1.1.3. Interaction entre GHRH et SRIH pour le contrôle de la sécrétion de GH

Données anatomiques

La présence d'une immunoréactivité SRIH au niveau des terminaisons axonales au sein du noyau arqué et ventromédian, deux régions au niveau desquelles il y a production de GHRH, suggère une interaction entre ces deux neuropeptides (Figure 4). Par immunohistochimie, plusieurs varicosités axonales somatostatinergergiques ont été trouvées entourant les neurones à GHRH (Liposits et al 1988), ceci concorde avec l'hypothèse d'une association synaptique. De plus au sein de la zone externe de l'éminence médiane, les terminaisons axonales de la GHRH et de la SRIH ont la même distribution et sont proches. Des études associant l'autoradiographie à l'immunohistochimie ont également apporté des

preuves quant à l'interaction entre la SRIH et la GHRH. L'une d'elle a montré une co-localisation des sites de liaison de la SRIH marquée à l'iode 125 dans le noyau arqué avec les neurones contenant une immunoréactivité GHRH confirmant l'interaction entre ces deux peptides dans cette région (Epelbaum 1992). De plus, plusieurs preuves ont été apportées quant à l'implication directe de la SRIH dans la régulation de la GHRH, notamment avec des données montrant une co-localisation des récepteurs à la SRIH avec les neurones à GHRH du noyau arqué (Bertherat et al 1992, McCarthy et al 1992). Cependant en ce qui concerne les terminaisons axonales des neurones à GHRH, seulement peu d'entre elles sont proches des neurones à SRIH (Willoughby et al 1989) suggérant une relative indépendance de la SRIH par rapport à la GHRH.

Données physiologiques

Des études *in vivo* ont également apporté des arguments en faveur d'une interaction entre la SRIH et la GHRH :

- L'administration intracérébro-ventriculaire de SRIH à des rats anesthésiés (Abe et al 1978) ou non (Lumpkin et al 1981) provoque une augmentation de la GH plasmatique en partie dépendante de la GHRH hypothalamique (Murakami et al 1987). Parallèlement, l'administration intracérébro-ventriculaire d'anticorps anti-SRIH a pour conséquence une élévation de la concentration en GHRH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Plotsky and Vale 1985). Des lésions électrolytiques dans l'aire pré-optique médiane (MPOA) ou dans l'hypothalamus antéro-latéral ont pour effet d'éliminer tout marquage immunologique dans l'éminence médiane et provoquent une élévation de la concentration plasmatique de GH accompagnée de l'abolition de la pulsativité de sa sécrétion (Katakami et al 1988)
- Chez le rat mâle qui a subi ces lésions dans la MPOA et chez lequel la concentration plasmatique de GH est augmentée, l'administration d'anticorps anti-GHRH inhibe la sécrétion de GH (Katakami et al 1988). Des injections intracérébroventriculaires de GHRH conduisent à une inhibition de la sécrétion de GH passant par une augmentation des taux de SRIH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Mitsugi et al 1990). Il est également important de noter que la GHRH ne peut stimuler la sécrétion de GH que lorsque le tonus somatostatinergique est bas (Tannenbaum and Ling 1984).

4.1.1.4. Dimorphisme sexuel du mode de sécrétion de GH

Des différences liées au sexe dans le contrôle de la sécrétion de GH par la SRIH et la GHRH existent, particulièrement chez le rat, mais également chez les primates. Elles comprennent une différence de réponse à la GHRH exogène (Clark and Robinson 1985, Wehrenberg et al 1985), du nombre de cellules GHRH et SRIH immunoréactives (Ganzetti et al 1986) ainsi que de l'expression de GHRH et SRIH dans l'hypothalamus (Argente et al 1991, Maiter et al 1991). Ainsi, chez le rat mâle, le niveau d'expression de la SRIH dans le noyau

périvericulaire de l'hypothalamus est plus élevé que chez la femelle (Chowen-Breed et al 1989). Ces derniers résultats suggèrent que la SRIH joue un rôle important dans le mode de sécrétion de GH et le dimorphisme sexuel et sont confirmés par des données obtenues *in vivo* :

- L'injection aigüe d'anticorps anti-SRIH chez des rats mâles provoque une augmentation des valeurs basales de GH mais n'altère pas les paramètres de la sécrétion de GH alors que la même injection chez la femelle conduit à l'augmentation de la concentration de GH plasmatique, de l'amplitude des pics ainsi que des valeurs basales (Painson and Tannenbaum 1991).
- L'injection d'anticorps anti-GHRH n'a pas d'effet sur les valeurs basales de GH chez les rats mâles mais augmente ces valeurs basales chez la femelle (Painson and Tannenbaum 1991).
- Chez les rats castrés, la testostérone induit l'augmentation de l'expression de SRIH (Argente et al 1991, Chowen-Breed et al 1989) et chez les femelles, l'ovarectomie conduit à une augmentation de l'expression de SRIH qui est réversée par l'administration d'oestradiol (Grilli et al 1996).

Le dimorphisme sexuel lié à l'expression du gène de la SRIH est visible dès 10 jours (post-natal) et est observable tout au long du développement (Argente et al 1991). Chez la femelle, le mode de libération de la somatostatine en partie influencé par l'effet inhibiteur des estrogènes semble ainsi être continu plutôt que cyclique. Ceci influençant ensuite les niveaux de base de sécrétion de GH qui sont plus élevés chez les individus de ce sexe (Jansson et al 1984).

4.1.1.5. *Les autres facteurs hypothalamiques*

- Le neuropeptide Y : NPY

Le NPY est un peptide de 36 acides aminés isolé à partir de cerveau de porc (Tatemoto et al 1982) et est un membre de la famille des polypeptides pancréatiques très abondant au sein du système nerveux central (Allen et al 1983). Au niveau de l'hypothalamus, ce peptide est très abondant dans le noyau arqué et les neurones qui le synthétisent projettent en majorité vers le paraventriculaire mais également vers le périvericulaire (de Quidt and Emson 1986).

Le NPY possède une action inhibitrice sur la sécrétion de GH. Chez le rat, son injection en i.c.v. inhibe la sécrétion de GH (McDonald et al 1985) et l'injection d'un anticorps anti-NPY produit, au contraire, une élévation des concentrations plasmatiques en GH (Rettori et al 1990). Cette action inhibitrice du NPY sur la sécrétion de GH pourrait être relayée par la stimulation de la libération de SRIH comme cela a été montré *in vitro* (Rettori et al 1990). Cette dernière donnée est renforcée par la démonstration de l'existence de connexion synaptique entre les terminaisons axonales contenant le NPY et les neurones à SRIH au niveau de l'hypothalamus antérieur (Hisano and Daikoku 1991). De plus, le NPY inhibe la sécrétion de GH induite par la GHRH à partir de tumeur hypophysaire humaine (Adams et al

1987). L'action inhibitrice sur la GH du NPY pourrait être relayée de manière plus indirecte. En effet, des terminaisons nerveuses à NPY sont retrouvées à proximité des neurones à POMC (Broberger et al 1997, Horvath et al 1992) et à galanine (Horvath et al 1996) et les récepteurs du NPY, NPY-R1 et NPY-R2, sont exprimés respectivement sur les neurones à POMC et à NPY du noyau arqué (Broberger et al 1997).

- La corticolibérine (CRH)

La CRH est un peptide de 41 acides aminés capable de stimuler la sécrétion d'hormone corticotrope (ACTH) à partir de l'hypophyse antérieure (Spiess et al 1981). Elle est synthétisée par des neurones principalement situés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Swanson et al 1983) dont une partie envoie des projections vers l'éminence médiane et est responsable des actions hypophysiotropes du peptide. La CRH réduit la sécrétion de GH basale ou induite par la GHRH chez le rat (Katakami et al 1985 , Ono et al 1984). Cet effet est aboli par un traitement avec un anticorps anti-SRIH suggérant que l'action de la CRH est en partie due à l'activation des neurones à SRIH (Katakami et al 1985). De plus in vivo, la CRH stimule la libération de SRIH au niveau hypothalamique (Cattaneo et al 1996) et augmente la concentration en SRIH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Mitsugi et al 1990). Ces données sont concordantes avec la démonstration d'une connexion synaptique directe entre les neurones à SRIH et CRH (Hisano and Daikoku 1991). L'action de la CRH pourrait également passer par une modification de l'activité des neurones à GHRH puisque l'expression de la GHRH et l'amplitude des pics sécrétoires de GH sont augmentées par l'application i.c.v d'un antagoniste de la CRH (Mounier et al 1997). Ainsi, la CRH est un médiateur important de la suppression de la sécrétion de GH suite à un stress chez le rat.

- La galanine

La galanine est un peptide de 29 acides aminés (Bedecs et al 1995), largement distribué au sein du système nerveux central et particulièrement au niveau de l'hypothalamus. Les neurones à galanine co-localisent en partie avec les neurones à GHRH du noyau ARC et possèdent des terminaisons nerveuses au niveau de l'éminence médiane (Bertherat et al 1995, Cuttler 1996). Chez l'homme et le rat, la galanine induit l'augmentation de la sécrétion de GH (Bauer et al 1986, Ottlecz et al 1986) et joue un rôle dans la génération des pics de GH : l'injection d'un anticorps anti-galanine conduit à l'altération de la pulsativité de la sécrétion de GH (Bertherat et al 1995). La galanine stimule la libération de GHRH à partir d'explant hypothalamique in vitro (Kitajima et al 1989, Merchenthaler et al 1993), suggérant que la stimulation de GH de la part de la galanine passe en partie par la stimulation des neurones à GHRH. Ces données in vitro sont confirmées chez le rat, chez lequel un traitement avec un anticorps anti-GHRH abolit l'augmentation de

sécrétion de GH induite par la galanine (Cella et al 1988). La galanine agit également directement au niveau de l'hypophyse pour stimuler la libération de GH (Guerineau et al 1990).

- Les autres neuropeptides hypothalamiques

D'autres neuropeptides hypothalamiques influencent la sécrétion de la GH en modulant la SRIH et/ou la GHRH tels que :

La proopiomélanocortine (POMC) est un précurseur protéique produit au niveau de l'hypophyse, de l'hypothalamus (Arc) et des mélanocytes et dont le clivage par des protéines convertases spécifiques des différents tissus produit plusieurs peptides dérivés et biologiquement actifs : opioïdes (mét-enképhaline) et endorphines (β -endorphine), ACTH, mélanotropines (α , β et γ -MSH) et CLIP. L'administration chez le rat de l' α -MSH ou de la β -endorphine entraîne l'augmentation des concentrations plasmatiques de GH (Bruni et al 1977, Rivier et al 1977).

La thyroïdolibérine (TRH) stimule la sécrétion de GH au niveau de l'hypophyse aussi bien in vivo qu'in vitro (Boockfor et al 1985, Le Dafniet et al 1985) et l'inhibe au niveau de l'hypothalamus via les neurones à SRIH (Harvey et al 1990, Katakami et al 1985).

Le peptide vasoactif intestinal stimule la sécrétion de GH au niveau hypothalamique (Müller 1987) et au niveau hypophysaire (Soliman et al 1995).

4.1.2. Les neurotransmetteurs hypothalamiques ou extra-hypothalamiques

La SRIH et la GHRH sont toutes deux soumises à modulations par d'autres peptides hypothalamiques et par un réseau complexe de neurotransmetteurs pour finement réguler la sécrétion de la GH (Table1).

- Les catécholamines

Au niveau central les voies adrénergiques stimulent la sécrétion de GH via le récepteur α_2 -adrénergique chez l'homme et le rat (Müller et al 1989). Ainsi, l'inhibition de la synthèse d'adrénaline ou de la noradrénaline inhibe les pics spontanés de GH et cet effet est restauré par la clonidine, agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques (Krulich et al 1982, Negro-Vilar et al 1979). De plus l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques, chez des rats, induit une augmentation des concentrations plasmatiques de GH accompagnée d'une augmentation des contenus hypophysaires en GH (Cella et al 1986). Ce dernier effet des récepteurs α_2 -adrénergiques sur la synthèse de GH semble en partie dépendant de la GHRH hypothalamique (Miki et al 1984). En ce qui concerne l'effet de l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques sur la sécrétion de GH, les données sont moins claires. Il en ressort cependant que l'activation de ces récepteurs conduit à l'inhibition de la sécrétion de GH chez le rat probablement en passant par une stimulation de la libération de SRIH Krulich (Krulich et al 1982).

La sécrétion de GH est également impactée par l'activation des récepteurs β -adrénergiques. Ainsi, le salbutamol, agoniste du récepteur β_2 -adrénergique, inhibe la stimulation de la sécrétion de GH induite par la GHRH chez l'homme (Ghigo et al 1990a). Ces effets peuvent être expliqués par une action de la voie β -adrénergique via la stimulation des neurones à SRIH.

Enfin les effets de la dopamine sur la sécrétion de GH sont complexes et parfois contradictoires. La dopamine est capable de stimuler aussi bien la libération de SRIH que de GHRH au niveau de l'hypothalamus chez le rat (Kitajima et al 1989).

- La sérotonine

Les voies centrales serotoninergiques ont une influence stimulatrice sur la sécrétion de GH chez le rat (Arnold and Fernstrom 1981), cette donnée est moins claire pour l'homme chez lequel des résultats contradictoires ont été obtenu (Bivens et al 1973, Chihara et al 1976, Mendelson et al 1978). Ainsi chez le rat mâle vigile, l'inhibition de la tryptophane hydroxylase, impliquée dans la chaîne de synthèse de la sérotonine (5-HT), entraîne une inhibition de la sécrétion pulsatile de GH (Martin et al 1978).

- L'acétylcholine (ACh)

Des études chez le rat et l'homme ont montré un effet stimulateur de la part de l'ACh sur la sécrétion d'hormone de croissance. Chez l'homme notamment, l'injection d'un antagoniste muscarinique a eu pour effet la suppression du pic de GH nocturne associé au sommeil à ondes lentes (Mendelson et al 1978).

Facteurs hypothalamiques	
	Action sur la GH
GHRH	+
SRIH	-
NPY	-
POMC (α-MSH, β-endorphine)	+
CRH	-
TRH	+/-
Galanine	+
VIP	+
Neurotransmetteurs	
Agonistes α-1 adrénergiques	-
Agonistes α-2 adrénergiques	+
Agonistes β-2 adrénergiques	-
Sérotonine	+
Dopamine	+
Facteurs périphériques	
IGF-1	-
Glucocorticoïdes	+
Leptine	+
Glucose	+/-
Acides Aminés	+
Ghréline	+
GH	-

Tableau 1: Principaux facteurs centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH

4.1.3 Modèles pour l'interaction entre les différents facteurs pour régulation de la sécrétion de GH

La sécrétion de GH est modulée par une interaction complexe entre la SRIH et la GHRH qui chez le rat mâle conduit à une sécrétion plusatile de GH d'une périodicité de 3,3h d'après l'une des premières études s'étant intéressé au rythme de sécrétion de GH (Tannenbaum and Martin 1976). Quelques années plus tard le premier modèle de genèse du rythme ultradien de sécrétion de GH est proposé (Tannenbaum and Ling 1984). Dans ce modèle, SRIH et GHRH sont sécrétés en opposition de phase depuis l'hypothalamus ver le système porte hypothalamo-hypophysaire, la SRIH est à l'origine des valeurs basales et de la genèse du rythme de sécrétion de GH alors que la GHRH module l'amplitude des pics. De plus, la périodicité des pics de GH de 3,3h est intégrée à ce modèle. Cependant ce modèle n'explique que le mode de sécrétion de GH chez le rat mâle mais pas chez la femelle, chez laquelle la périodicité des pics de GH est plus irrégulière et l'amplitude plus basse (Clark and Robinson 1985). En 1998, un nouveau modèle est proposé par Wagner et collaborateurs, dans lequel la GHRH est libérée avec un rythme d'environ 1h et la SRIH de 3h et qui intègre la régulation négative des neurones à GHRH de la part de la SRIH ainsi que la boucle de rétrocontrôle positif exercée par la GH sur les neurones à SRIH (Wagner et al 1998). En 2002, Farhy et collaborateurs développent un modèle algorithmique permettant de modéliser la régulation de la sécrétion de GH, ce modèle prend en compte le dimorphisme sexuel observé ainsi que le rétrocontrôle négatif de la GH sur les neurones à GHRH (Farhy et al 2002). La périodicité aléatoire des pics de sécrétion de GH chez la femelle serait due à une libération plus variable de SRIH (Farhy et al 2002, MacGregor and Leng 2005). Enfin en 2009, un modèle intégrant le rôle de la ghréline et des neurones à NPY est proposé Wagner (Wagner et al 2009). Ce modèle sera détaillé dans la partie 3, chapitre 2 concernant le rôle de la ghréline dans la sécrétion de GH.

4.2. Les facteurs périphériques

De nombreux facteurs périphériques exercent également un contrôle sur la sécrétion de GH. Parmi eux les stéroïdes sexuels, qui ont un rôle plus ou moins important au cours de la vie et en fonction du sexe, les hormones thyroïdiennes ou les cytokines (Table 1). Seuls seront détaillés dans le chapitre qui suit les rétrocontrôles exercés par la GH elle-même et l'IGF-1, ainsi que les effets des glucocorticoïdes, de la leptine et des facteurs nutritionnels et enfin de la ghréline.

4.2.1. L'insulin-like growth factor I: IGF-I

L'insulin-like growth factor I participe à la croissance et la fonction de beaucoup d'organes et est synthétisée principalement dans le foie (Daughaday and Rotwein 1989). L'IGF-1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH. Il inhibe la libération de GH

hypophysaire in vitro et stimule la libération de SRIH à partir d'explants hypothalamiques (Berelowitz et al 1982). In vivo, l'injection ICV d'IGF-1 supprime la sécrétion de GH spontanée chez le rat (Tannenbaum et al 1983). L'IGF-1 a également une action inhibitrice sur l'expression du gène de la GH et celui du facteur de transcription Pit-1 (Soto et al 1995). L'IGF-1 agit au niveau hypothalamique en diminuant l'expression de GHRH et stimulant celle de SRIH chez l'homme et le rat (Ceda 1995, Sato and Frohman 1993).

4.2.2. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes amplifient l'action de la GHRH sur les cellules somatotropes (Michel et al 1984, Tamaki et al 1996). Parallèlement, l'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, réduit l'expression hypophysaire du récepteur à la SRIH, SST2 (Lam et al 1996). L'administration aiguë de glucocorticoïdes stimule la sécrétion de GH en augmentant la sensibilité des cellules somatotropes à la GHRH et en diminuant la réponse de ces mêmes cellules à la SRIH. De plus, les glucocorticoïdes peuvent agir directement au niveau de l'hypophyse, sans passer par ces mécanismes de modulation de la GHRH et SRIH, pour stimuler la synthèse et la libération de GH (Thakore and Dinan 1994). Cependant l'infusion longue de quantité supra physiologique de glucocorticoïdes réduit la croissance somatique (Loeb 1976), la sécrétion spontanée ou induite de GH chez le rat (Wei et al 1993) et l'homme (Frantz and Rabkin 1964, Kaufmann et al 1988) ainsi que la concentration d'IGF-1 circulante (Thakore and Dinan 1994). Ces effets inhibiteurs de hautes doses de glucocorticoïdes sont principalement attribués à la stimulation de la SRIH (Fernandez-Vazquez et al 1995, Nakagawa et al 1987). Pour conclure, en fonction de la dose et de la longueur de l'administration, les glucocorticoïdes provoquent deux types de réponses : en administration aiguë ils stimulent l'axe somatotrope et en administration prolongée, ils l'inhibent.

4.2.3. La leptine et les signaux métaboliques et nutritionnels

- La leptine

La leptine est une hormone anorexigène produite par les adipocytes qui renseigne le système nerveux central pour la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Zhang et al 1994). Le rôle et les mécanismes par lesquels la leptine régule le comportement alimentaire seront détaillés dans le premier chapitre de la deuxième partie consacrée au comportement alimentaire.

Les concentrations plasmatiques de leptine sont inversement corrélées aux concentrations plasmatiques en GH (Tuominen et al 1997). La leptine a un effet stimulateur sur la sécrétion de GH (Carro et al 1997, Tannenbaum et al 1998). Les souris *ob/ob* déficiente en leptine présente une diminution de la fonction de l'axe somatotrope (Zhang et al 1994). La leptine agit au niveau de l'hypothalamus en partie en inhibant la fonction des neurones à

NPY/AgRP (Stephens et al 1995) et l'injection ICV de leptine chez le rat diminue l'expression de NPY dans le noyau ARC (Schwartz et al 1996). Ces résultats suggèrent que l'action stimulatrice de la leptine sur la sécrétion de GH passe en partie par l'inhibition de ces neurones. La leptine semble également agir en diminuant la libération de SRIH et en augmentant celle de GHRH. Ainsi, suite à l'administration d'anticorps anti-GHRH, la sécrétion de GH en réponse à la leptine est bloquée mais augmentée après l'administration d'anticorps anti-SRIH (Carro et al 1999).

- Le glucose

La sécrétion de GH en réponse à l'hypo ou l'hyper-glycémie varie en fonction de l'espèce. Chez l'homme, l'hypoglycémie, qu'elle soit ou non provoquée par l'insuline, stimule la sécrétion de GH (Brodows et al 1973) alors que l'administration de glucose l'inhibe (Scanlon et al 1996). Chez le rat, l'hypoglycémie inhibe la sécrétion pulsatile de GH (Tannenbaum and Martin 1976). Cet effet inhibiteur de l'hypoglycémie semble lié à une stimulation de la libération de SRIH (Murao et al 1994). L'hyperglycémie ponctuelle n'a quasiment pas d'effet sur la GH alors que les rats diabétiques ont des défauts de sécrétion de GH (Giustina and Wehrenberg 1994).

- Les acides aminés

Les acides aminés stimulent la sécrétion de GH, seuls ou inclus au sein de protéines lors des repas (Besset et al 1982, Isidori et al 1981). Parmi les acides aminés les plus puissants pour cette stimulation compte l'arginine, mais aussi la lysine, la tyrosine, la glycine ou le tryptophane (Knopf et al 1966). Les effets de l'arginine sur la sécrétion de GH semblent être exercés par le biais de la suppression de la libération de SRIH (Ghigo et al 1990b).

- La ghréline

La ghréline a été découverte comme le ligand endogène du récepteur des GH sécrétagogues (Kojima et al 1999), elle stimule ainsi la sécrétion de GH. Le rôle de la ghréline pour la sécrétion de GH sera détaillé dans la troisième partie au sein du chapitre 2 concernant les fonctions des peptides dérivés de la préproghréline.

4.2.4. La GH : rétrocontrôle négatif

Les premières données ont montré, chez le rat avec des tumeurs somatotropes ectopiques, une réduction des contenus hypophysaires de GH (McDonald et al 1985). Puis des observations allant dans le même sens ont été réalisées : chez le rat, l'infusion de GH bloque la libération de GH induite par l'hypoglycémie (Muller and Pecile 1966), chez l'homme, le traitement à la GH prévient l'élévation des taux de GH circulante induite par l'hypoglycémie (Abrams et al 1971). Toutes ces données suggèrent que l'élévation de la

concentration plasmatique en GH induit un rétrocontrôle négatif sur sa propre sécrétion. Des expériences in vivo ont confirmé ces observations : chez le rat, des injections IV (Clark et al 1988, Willoughby et al 1980) ou ICV (Abe et al 1983, Tannenbaum 1980) de GH entraînent une diminution de l'amplitude des pics de GH.

Ce rétrocontrôle négatif est associé à une élévation de la concentration en SRIH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Chihara et al 1979) et à une diminution de la concentration en GHRH (Ganzetti et al 1986).

Le rétrocontrôle de la GH au niveau de l'hypothalamus implique la liaison de la GH à son propre récepteur pour la régulation de la SRIH et de la GHRH. Le récepteur de la GH est largement exprimé au sein des noyaux paraventriculaire, périventriculaire et arqué de l'hypothalamus (Burton et al 1992). Au niveau des noyaux périventriculaire et paraventriculaire, les neurones à SRIH co-expriment le récepteur à la GH suggérant que la GH agit directement au niveau de ces neurones. Cependant au niveau de l'ARC, bien que le récepteur à la GH soit présent, il n'est que très peu exprimé par les neurones à SRIH et GHRH, indiquant que les effets de la GH sont indirects sur ces populations neuronales (Burton et al 1992). Il a été plus tard démontré que l'injection de GH induit l'expression de c-Fos dans les neurones à NPY du noyau ARC (Kamegai et al 1994), un grand nombre d'entre eux exprimant le récepteur à la GH (Chan et al 1996).

Partie 2 : Le comportement alimentaire

1. Régulation de l'homéostasie énergétique

L'homéostasie énergétique dépend de la capacité de l'organisme à ajuster la prise alimentaire et la dépense énergétique en fonction de l'état des réserves énergétiques disponibles au sein de l'organisme au cours du temps (Morton et al 2006). Différents signaux provenant de la périphérie informent le système nerveux central du statut énergétique et de l'état des réserves. Ces informations sont relayées notamment au niveau de deux régions : l'hypothalamus et le complexe vagal-dorsal (CVD). (Figure 6)

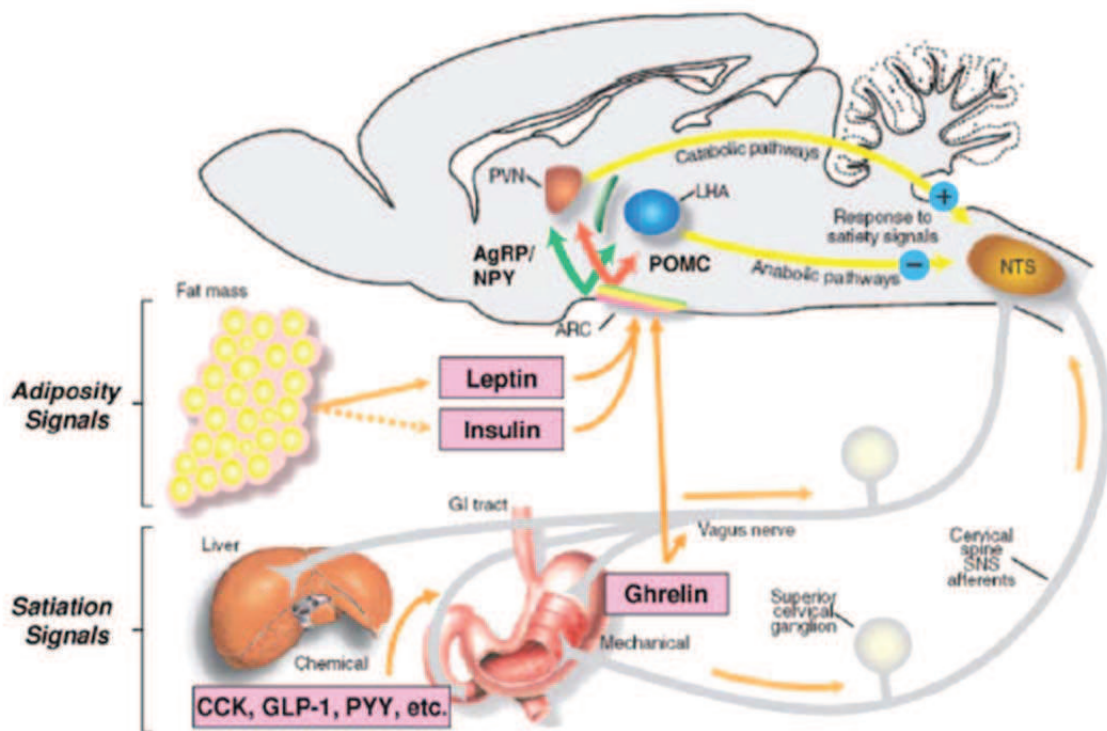


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie énergétique. (Woods et D'Alessio 2008)

1.1. Régulation à court terme

Chez la plupart des vertébrés la prise alimentaire se fait sous forme de « repas ». Plusieurs facteurs peuvent influencer l'initiation des repas, comme l'odorat ou la vue, alors que les mécanismes de satiété sont plus prédictibles et reposent sur l'ingestion de nutriments, la distension gastrique ou encore la libération de peptides gastro-intestinaux. La

préservation de l'homéostasie énergétique passe ainsi par l'ajustement des paramètres des repas : leurs tailles, leurs durées et leurs fréquences.

1.1.1. Les macronutriments

- Le glucose

Au niveau du système nerveux central, le glucose ne sert pas seulement de substrat mais participe également au maintien de l'homéostasie énergétique. Des neurones gluco-senseurs sont présents et se répartissent en deux catégories : les uns sont excités par le glucose (GE) et les autres inhibés (GI) (Levin et al 2004). De manière générale ces neurones gluco-senseurs se trouvent au niveau de noyaux ou régions impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire tels l'ARC, le VMH ou la LHA (Anand et al 1964).

- Les lipides

Les acides gras sont capables de promouvoir la satiété et participent donc également au contrôle de l'homéostasie énergétique. Ainsi, il a été montré que l'administration de lipides inhibe la prise alimentaire (Obici et al 2002b). Les taux d'acides gras libres ou circulants sont intégrés sein du système nerveux central au niveau de neurones sensibles aux lipides se trouvant notamment dans la LHA (Oomura et al 1975). De plus, le type de lipides joue également un rôle dans la réponse de satiété. Les acides gras polyinsaturés exercent par exemple un effet satiétogène plus important comparés aux acides gras mono-insaturés ou saturés (Lawton et al 2000, Migrenne et al 2011).

1.1.2. Les signaux mécaniques

L'innervation du tractus gastro-intestinal comporte des récepteurs sensoriels sensibles à la texture des aliments mais aussi au stress mécanique (Smith 1996). Suite à la prise alimentaire, ces informations sont immédiatement transmises au système nerveux central par le biais de fibres afférentes au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) pour induire des signaux de satiété et la terminaison du repas. Ces informations liées à la distension gastroduodénale mais aussi à la qualité des nutriments ingérés sont intégrées par des neurones sensoriels du nerf vague avant d'être relayées au niveau du NTS (Schwartz et al 1991a, Schwartz et al 1993).

1.1.3. Les peptides gastro-intestinaux

Plusieurs hormones gastriques informent le système nerveux central de l'état nutritionnel immédiat de l'organisme. Le système nerveux central adapte ainsi en conséquence le comportement alimentaire.

- La cholecystokinine (CCK)

La CCK est produite tout le long du tractus gastro-intestinal, cependant, elle est plus particulièrement synthétisée par les cellules L-entéroendocrines du duodénum et du jéjunum (Buffa et al 1976). La concentration de CCK augmente rapidement à la suite d'un repas (Liddle et al 1985) notamment en présence de lipides et de protéines dans la lumière intestinale (Sayegh and Ritter 2003). L'administration périphérique de CCK entraîne une réduction de la prise alimentaire de manière dose dépendante due à la réduction de la taille et de la durée des repas chez le rat (Gibbs et al 1973) comme chez l'homme (Kissileff et al 1981). L'administration centrale de CCK entraîne également une réduction de la prise alimentaire chez le rat, cet effet anorexigène est plus important lors de l'administration concomitante de leptine (Matson et al 2000). La CCK existe sous différentes formes biologiquement actives qui diffèrent par le nombre d'acides aminés. La forme majoritaire circulante et au niveau intestinal est la CCK-33 (Rehfeld et al 2001).

Deux types de récepteurs à la CCK ont été identifiés : CCK1 et CCK2 (Moran et al 1986, Wank et al 1992). La CCK agit principalement par l'intermédiaire du récepteur CCK1 (Melville et al 1992), qui est présent sur les fibres vagues afférentes innervant la muqueuse intestinale mais aussi au niveau central dans le NTS et l'hypothalamus (Moran et al 1986). Ces fibres projettent vers le NTS au niveau du tronc cérébral et sont impliquées dans la terminaison des repas. Ainsi, la vagotomie gastrique bloque les effets satiétogènes de la CCK (Smith et al 1981). Les souris déficientes pour le récepteur CCK1 (CCK1 -/-) ont une masse corporelle identique à celle des souris sauvages cependant la structure de leurs repas diffère (Bi et al 2004). Sous régime riche en graisse, les souris CCK1 -/- continuent de manger la même quantité de nourriture que sous régime standard alors que chez les souris sauvages une diminution de la taille des repas est observée (Whited et al 2006). Ainsi il semble que le récepteur CCK1 soit impliqué dans l'ajustement de la taille des repas et plus particulièrement sous un régime riche en graisse (Lo et al 2008).

- Le peptide YY (PYY)

Le PYY est un peptide de 36 acides aminés, de la même famille que le NPY, produit par les cellules L-entéroendocrines et plus particulièrement dans la partie distale du tractus gastro-intestinal au niveau de l'iléon, du côlon et du rectum (Adrian et al 1985, Lundberg et al 1982). Deux formes de PYY sont retrouvées dans la circulation générale, PYY (1-36) et PYY (3-36), c'est cette deuxième forme qui est active (Grandt et al 1994). A la suite d'un repas le PYY est sécrété dans la circulation générale et sa concentration maximale est influencée par le nombre de calories ingérées et la composition du repas notamment par la présence de

carbohydrates et de lipides (Adrian et al 1985, Greeley et al 1989). L'administration périphérique de PYY (3-36) réduit la prise alimentaire et provoque une diminution de la masse corporelle (Batterham et al 2002, Morley and Flood 1987). Chez l'homme également le PYY a des effets anorexigènes qui sont aussi observés chez les patients atteints d'obésité (Batterham et al 2003).

Comme les autres peptides de la même famille, le PYY exerce ces effets par le biais des récepteurs de la famille des récepteurs Y couplés aux protéines G qui comprend 5 sous types (Blomqvist and Herzog 1997). Le PYY (3-36) se fixe préférentiellement sur les récepteurs Y2 (Larhammar 1996), qui sont exprimés au niveau des neurones à NPY du noyau ARC (Broberger et al 1997). L'injection de PYY (3-36) directement au niveau du noyau ARC inhibe la prise alimentaire comme l'administration d'un agoniste spécifique des récepteurs Y2 (Lumb et al 2007). Des études suggèrent que les effets anorexigènes du PYY (3-36) passent par l'inhibition des neurones à NPY et par une augmentation modérée de l'activité des neurones à POMC (Batterham et al 2002). Cependant, les neurones à POMC ne sont pas indispensables à l'action anorexigène du PYY puisque ces effets sont préservés en absence de signal melanocortine (Adams et al 2004).

- Le polypeptide pancréatique (PP)

Comme le PYY et le NPY, le PP est membre de la famille des peptides pancréatiques. C'est un peptide de 36 acides aminés synthétisé au niveau des cellules PP du pancréas endocrine et dans une moindre mesure au niveau du côlon et du rectum (Conlon 2002). La concentration de PP croît en période post-prandiale proportionnellement à la quantité de calories ingérées (Track 1980). L'administration de PP chez le rongeur comme chez l'homme mène à la réduction de la prise alimentaire (Batterham and Bloom 2003).

Comme le PYY (3-36), le PP exerce ses effets via la famille des récepteurs Y, se fixant préférentiellement aux sous types Y4 et Y5 (Larhammar 1996). En plus de ses effets sur la prise alimentaire, le PP réduit la vitesse de la vidange gastrique. Les souris transgéniques qui surexpriment le PP présentent une diminution de leur prise alimentaire et de leur masse corporelle par rapport aux animaux contrôles (Ueno et al 1999).

- Les peptides dérivés du pre-proglucagon

Le pre-proglucagon est un précurseur dont le clivage par les prohormones convertases mène à la production de GLP-1 et 2 et d'oxyntomoduline (OXM) en fonction du site de synthèse (Bataille et al 1988, Blache et al 1988).

Le GLP-1

Le GLP-1 est un peptide de 30 acides aminés sécrété dans la circulation générale à la suite d'un repas (Vahl et al 2010) par les cellules L-entéroendocrines du tractus gastro-

intestinal mais également les cellules α -pancréatiques (Eissele et al 1992) et les neurones du NTS au niveau du système nerveux central (Drucker and Asa 1988, Han et al 1986, Jin et al 1988). Au niveau périphérique, le GLP-1 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie glucidique par le biais de la modulation de la vidange gastrique et de la stimulation de la sécrétion d'insuline (D'Alessio et al 1996). Les concentrations circulantes de GLP-1 s'élèvent après un repas et le jeûne réduit l'expression de pré-proglucagon au niveau de l'intestin (Hoyt et al 1996). Chez le rat, l'administration aigue de GLP-1 au niveau du 3^e ventricule entraîne une diminution de la prise alimentaire sur 2h (Turton et al 1996). Chez l'homme, l'administration en périphérie de GLP-1 entraîne également une réduction de la prise alimentaire (Gutzwiller et al 1999, Verdich et al 2001) ainsi qu'une diminution de la vitesse de la vidange gastrique qui pourrait également influencer la prise alimentaire (Näslund et al , Verdich et al 2001)

Le récepteur du GLP-1 est exprimé au niveau du système nerveux central dans des régions impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire comme le noyau paraventriculaire, le noyau supra-optique ou le noyau ARC (Kanse et al 1988, Shughrue et al 1996) mais aussi au niveau du tronc cérébral dans le NTS (Goke et al 1995). L'administration centrale de GLP-1 mène à l'activation de c-Fos particulièrement au niveau du paraventriculaire alors que seule une augmentation modérée de l'activation neuronale est observée au niveau de l'ARC (Dakin et al 2001). De plus la vagotomie entraîne la suppression de l'effet anorexigène du GLP-1 ainsi que celui exercé sur la vidange gastrique (Imeryuz et al 1997).

L'oxyntomoduline (OXM)

L'oxyntomoduline a été identifiée pour son action inhibitrice sur les glandes oxyntique de l'estomac (Dubrasquet et al 1982). Comme le GLP-1, l'OXM est synthétisée par les cellules L-entéroendocrines de l'intestin et au niveau du système nerveux central. L'OXM est également sécrétée à la suite d'un repas et sa concentration est proportionnelle aux calories ingérées (Ghatei et al 1983, Le Quellec et al 1992). Chez l'homme et le rat, l'OXM promeut la satiété. L'administration en i.c.v. ou directement au niveau du paraventriculaire ou de l'ARC d'OXM réduit la prise alimentaire (Dakin et al 2001, Dakin et al 2004).

Aucun récepteur spécifique de l'OXM n'a été identifié à ce jour, mais des résultats suggèrent que l'action de l'OXM pourrait passer par le biais des récepteurs du GLP-1 (Baggio et al 2004, Dakin et al 2004). A la suite d'une injection périphérique d'OXM, une activation neuronale est observée dans le noyau ARC mais très peu au niveau du tronc cérébral contrairement à ce qui est observé suite à l'injection de GLP-1 (Yamamoto et al 2007).

- La ghréline

La ghréline est la seule hormone orexigène du tractus gastro-intestinal, son implication

dans le contrôle de la prise alimentaire sera détaillée dans la troisième partie au niveau du chapitre 2 consacré au rôle des peptides dérivés de la préproghréline dans le contrôle du comportement alimentaire.

1.2. Régulation à long terme

La régulation à long terme de l'homéostasie énergétique repose principalement sur deux hormones qui reflètent l'état de l'adiposité corporelle : l'insuline et la leptine (Figure 6). Ces deux hormones ont des taux circulants proportionnels à la masse grasse corporelle, sont anorexigènes et stimulent la perte de poids alors que leur inhibition entraîne une augmentation de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Schwartz et al 2000). Des études chez les invertébrés ont montré que l'insuline est un acteur clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Garofalo 2002, Kimura et al 1997) alors que la leptine est absente chez les invertébrés (Doyon et al 2001) ce qui suggère une apparition plus récente au cours de l'évolution.

1.2.1. L'insuline

L'insuline, seule hormone hypoglycémisante de l'organisme, joue un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie glucidique (Saltiel and Kahn 2001). Elle est sécrétée par les cellules β du pancréas endocrine en réponse à l'ingestion de nutriments (glucose ou acides aminés) mais également à la suite d'une stimulation par les hormones gastriques incrétines telles que le GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) ou GIP (Glucose dependant insulintropic peptide) (D'Alessio et al 2001).

En plus de ces actions en périphérie en faveur de la capture et du stockage du glucose, l'insuline exerce un rôle au niveau central. L'injection i.c.v. chronique d'insuline conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Woods et al 1979).

L'insuline agit au niveau central par le biais de son récepteur qui est présent dans l'hypothalamus notamment au niveau du noyau ARC (Baskin et al 1988, van Houten et al 1979). L'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre le récepteur à l'insuline au niveau de l'hypothalamus entraîne une hyperphagie ainsi qu'une insulino-résistance chez le rat (Obici et al 2002a).

Au sein de l'hypothalamus l'insuline a pour cible les neurones à NPY et à POMC. Chez le rat, elle inhibe l'augmentation de l'expression de NPY induite par le jeûne (Schwartz et al 1991b) et stimule l'expression de la POMC (Benoit et al 2002).

1.2.2. La leptine

La leptine est le produit du gène *ob*, isolée en 1994 et sécrétée majoritairement par les adipocytes (Zhang et al 1994). Les concentrations plasmatiques en leptine sont corrélées à la quantité de masse adipeuse de l'organisme (Maffei et al 1995). Les souris *ob/ob*

déficientes en leptine présentent une obésité et une hyperphagie qui peuvent être normalisées par l'administration de leptine (Halaas et al 1995). L'injection i.c.v. de leptine entraîne une diminution de la prise alimentaire ainsi que de la masse corporelle (Seeley et al 1996). De plus, chez les souris *ob/ob* l'expression de la POMC est réduite (Thornton et al 1997) alors que celle de NPY et AgRP est augmentée (Schwartz et al 2000, Shutter et al 1997) et un blocage de la signalisation des neurones à mélanocortine diminue la réponse à la leptine (Seeley et al 1997).

L'action de la leptine passe donc en partie par ces neurones à NPY/AgRP et POMC de l'hypothalamus au niveau desquels est exprimé la forme longue (LeprB) du récepteur à la leptine par lequel la majorité des effets anorexigènes de la leptine sont véhiculés (Cheung et al 1997, Mercer et al 1996). Le récepteur de la leptine appartient comme le récepteur de la GH à la superfamille des récepteurs de cytokines et après liaison de son ligand transduit le signal par la voie JAK-STAT (Bjorbaek et al 1997). La délétion des récepteurs à la leptine au niveau des neurones à POMC (Balthasar et al 2003) et/ou AgRP (van de Wall et al 2008) entraîne une obésité liée à une hyperphagie et à une diminution de la dépense énergétique ainsi qu'une hyperleptinémie.

De plus, l'administration de leptine au niveau du 4^e ventricule, entraîne également une diminution de la prise alimentaire et de masse corporelle (Grill and Kaplan 2001) suggérant une action de la leptine au niveau du tronc cérébral où l'expression du récepteur de la leptine a également été trouvée au sein du NTS (Mercer et al 1998a, Mercer et al 1998b).

La leptine est donc une hormone anorexigène qui stimule l'expression des neuropeptides anorexigènes, comme la POMC (Cowley et al 2001), et inhibe l'expression des neuropeptides orexigènes comme le NPY (Flier 2004).

2. Les différents centres régulateurs du comportement alimentaire

2.1. Un réseau central pour le contrôle de l'homéostasie énergétique

Classiquement, le contrôle de la prise alimentaire est attribué au dialogue entre deux régions principales : l'hypothalamus et le tronc cérébral. La première région recevant des signaux de la périphérie principalement des signaux dits d'adiposité exerçant un contrôle négatif et la deuxième recevant des informations immédiates de la part notamment du tractus gastro-intestinal sur la quantité et la qualité des nutriments ingérés. (Figure 6). Les dernières études concernant le comportement alimentaire suggèrent cependant que le dialogue entre ces deux régions est plus complexe.

2.1.1. L'hypothalamus : organisation des neurones senseurs du statut énergétique

Au sein de l'hypothalamus le noyau ARC joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. Situé à proximité du troisième ventricule et des capillaires sanguins fenêtrés de

l'éminence médiane, organe circumventriculaire, le noyau ARC est facilement accessible aux signaux hormonaux provenant de la périphérie. Ce noyau contient les neurones dits de « premier ordre », les neurones à NPY/AgRP ou POMC/CART qui exercent des effets orexigènes et anorexigènes respectivement. Ces neurones possèdent des projections axonales au niveau de régions contenant des neurones dits de « second ordre » telles que le noyau paraventriculaire (PVN) qui contient des neurones à CRH et TRH et l'aire hypothalamique latérale (LHA) et l'aire périfornicale (PFA) qui contient des neurones à MCH et à orexines. (Figure 7)

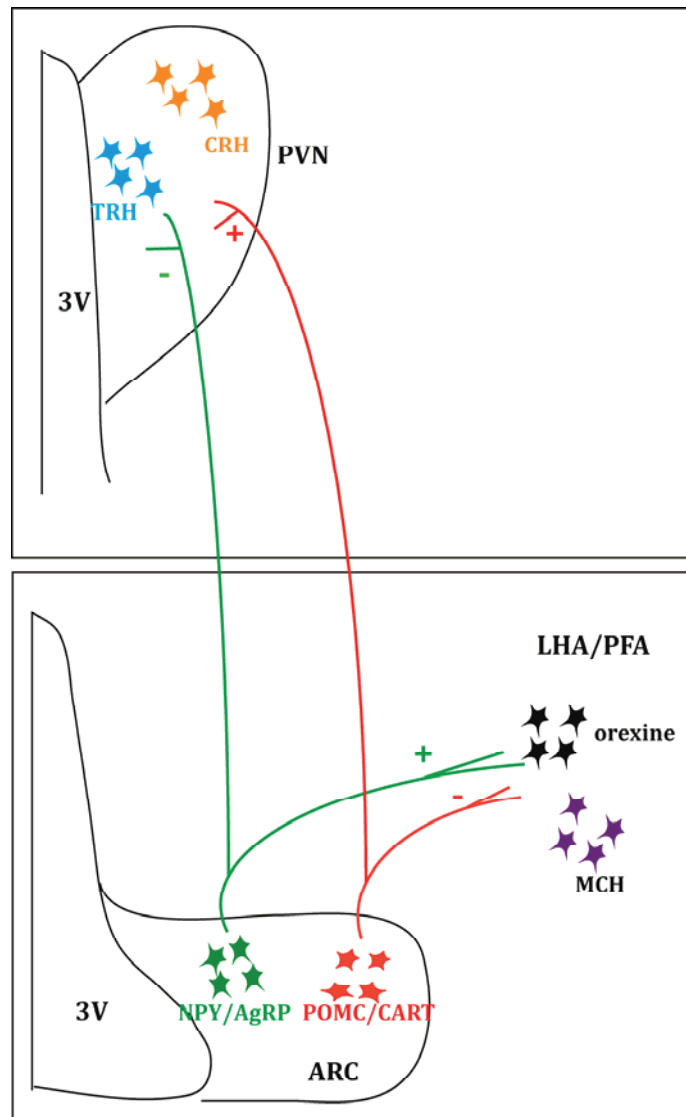


Figure 7 : Schéma représentant l'organisation des neurones impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire

3V : troisième ventricule, ARC : noyau arqué, NPY : neuropeptide Y, AgRP : agouti-related peptide, POMC : proopiomélanocortine, CART : cocaïne amphétamine related transcript, MCH : melanin concentrating hormone, LHA : aire hypothalamique latérale, PVN : noyau paraventriculaire, TRH : thyroïdolibérine, CRH : corticolibérine.

2.1.1.1. Les neurones orexigènes

- Les neurones à NPY/AgRP

Le NPY est l'un des membres de la famille des peptides pancréatiques et est un important peptide orexigène (Beck et al 2001). C'est l'un des peptides les plus abondants du système nerveux central (Allen et al 1983). Il est présent dans plusieurs régions du système nerveux central et plus particulièrement pour le contrôle du métabolisme énergétique, au niveau du noyau ARC avec des projections allant vers le noyau paraventriculaire (Bai et al 1985). Chez le rat, le jeûne conduit à une augmentation de l'expression de NPY et la prise alimentaire restaure les niveaux de base (Davies and Marks 1994). L'administration i.c.v. de NPY stimule la prise alimentaire chez le rongeur (Clark et al 1984) et chez d'autres mammifères tels que le mouton ou le singe (Larsen et al 1999, Miner et al 1989).

L'injection répétée de NPY directement au niveau du noyau paraventriculaire sur plusieurs jours conduit à l'hyperphagie, l'augmentation de la masse corporelle ainsi qu'à l'augmentation des stocks de graisse (Stanley et al 1986). L'un des effets du NPY est également la diminution de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun (Billington et al 1991). Ainsi le NPY promeut le gain d'énergie en favorisant la prise alimentaire parallèlement à la diminution de la dépense énergétique. L'administration d'oligonucléotides anti-sens de l'ARNm du NPY (Hulsey et al 1995) ou d'anticorps anti-NPY (Shibasaki et al 1993) entraîne une réduction de la prise alimentaire cumulée engendrée par une diminution de la taille et de la durée des repas ainsi qu'une réduction de la masse corporelle.

Les souris ayant subi l'ablation des neurones NPY/AgRP dès la période néonatale ainsi que les souris déficientes en NPY présentent une prise alimentaire et une masse corporelle équivalente à celle des souris sauvages (Erickson et al 1996), suggérant la mise en place de systèmes de compensations et la capacité de la leptine à réduire la prise alimentaire n'est pas altérée chez ces souris déficientes en NPY. Cependant l'ablation des neurones à NPY/AgRP à l'âge adulte entraîne une forte réduction de la prise alimentaire (Luquet et al 2005) suggérant la mise en place d'un système de compensation lors de la croissance qui ne peut l'être une fois arrivé à l'âge adulte.

Les effets du NPY sont exercés par le biais de la famille des récepteurs Y, préférentiellement par les sous types Y1 et Y5. Les antagonistes du récepteur Y1 suppriment les effets du NPY sur la prise alimentaire (Kanatani et al 1998 , Morgan et al 1998) et les souris déficientes en récepteur Y1 ne présentent pas d'augmentation de la prise alimentaire induite par le NPY et ont une renutrition plus faible à la suite d'un jeûne (Kushi et al 1998, Pedrazzini et al 1998). Les antagonistes du récepteur Y5 inhibent également la prise alimentaire (Kanatani et al 2000) mais n'ont pas d'effet sur l'augmentation de la prise alimentaire induite par le NPY. Les souris déficiente en récepteur Y5 ont une réponse au NPY altérée concernant la prise alimentaire (Marsh et al 1998).

L'**AgRP** (Agouti-Related Peptide), a été cloné en 1997, c'est un peptide de 132 acides aminés qui comporte 25% d'homologie avec la protéine agouti (Ollmann et al 1997, Shutter et al 1997). C'est un antagoniste (ou un agoniste inverse) endogène des récepteurs à mélanocortines, MC3R et MC4R (Ollmann et al 1997, Quillan et al 1998). Au niveau du système nerveux central, l'AgRP est exclusivement synthétisée dans le noyau ARC par des neurones qui projettent vers les noyaux paraventriculaire, dorsomédian ou encore l'aire hypothalamique latérale (Shutter et al 1997). L'expression de l'AgRP est fortement co-localisée (90%) avec celle du NPY dans le noyau ARC (Broberger et al 1998, Hahn et al 1998), ces neurones à NPY/AgRP agissent en faveur de la stimulation de la prise alimentaire. Comme l'expression de NPY, celle de l'AgRP augmente suite à un jeûne (Hahn et al 1998). L'administration i.c.v. d'AgRP entraîne une hyperphagie de longue durée, en comparaison avec les autres signaux orexigènes, celle-ci peut durer jusqu'à une semaine (Rossi et al 1998).

- Les neurones à MCH (Melanin-concentrating hormone)

L'augmentation de l'expression de MCH chez les souris à jeun (Qu et al 1996) implique ce peptide dans la régulation de la prise alimentaire. Des injections centrales et chroniques de MCH provoquent l'augmentation de la prise alimentaire, de la masse corporelle ainsi que de l'adiposité (Qu et al 1996), (Williams et al 2004). La MCH est exprimée au niveau de la zona incerta et de la LHA au sein de l'hypothalamus (Naito et al 1988). Les souris déficientes en MCH sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisse, cette résistance étant due à une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité locomotrice (Kokkotou et al 2005). Deux récepteurs à la MCH ont été identifiés, MCH-R1 et MCH-R2, cependant il semble que la MCH exerce ces effets préférentiellement par l'intermédiaire du MCH-R1 (Saito et al 2001).

- Les neurones à orexines

L'orexine ou hypocretine, est un peptide orexigène découvert en 1998, il en existe deux formes l'orexine A et B issues du clivage d'un même précurseur la prepro-orexine (Sakurai et al 1998). Les neurones à orexines sont localisés principalement au niveau de l'aire hypothalamique latérale et projettent vers un grand nombre de régions et au niveau de l'hypothalamus au sein de plusieurs noyaux dont le VMH, l'ARC, le DMH et le PVN.

Les orexines exercent leurs effets par le biais de deux récepteurs : OX1 et 2. L'administration d'orexine A ou B entraîne une augmentation de la prise alimentaire (Sakurai et al 1998). Des interactions synaptiques entre les neurones à orexine et à MCH ont été montrées (Guan et al 2002) suggérant un dialogue entre ces deux peptides pour l'exercice de leur effet stimulateur de la prise alimentaire. Les neurones à orexine reçoivent également des projections neuronales de la part de neurones à NPY (Fu et al 2004) et une partie d'entre eux expriment le récepteur de la leptine qui exerce un effet inhibiteur sur ces neurones (Funahashi et al 1999).

Les neurones à orexines et à MCH sont également impliqués dans les rythmes de veille/sommeil ce qui conforte l'interaction entre le statut métabolique et l'état de veille/sommeil (Verret et al 2003).

- Les neurones à 26RFA

Le 26RFA est un peptide présent chez tous les vertébrés et appartient à la famille des peptides RFamide (Chartrel et al 2011). Chez la souris l'administration i.c.v. de 26RFA induit une augmentation de la prise alimentaire (Chartrel et al 2003 , Do-Rego et al 2006). Le 26RFA est exprimé au niveau de l'hypothalamus dans les noyaux VMH, ARC ainsi qu'au niveau de la LHA (Gouarderes et al 2004) et le jeûne a un effet stimulateur de l'expression de ce peptide au niveau hypothalamique (Takayasu et al 2006). Le 26RFA exerce ses effets par le biais de son récepteur le GPR103 qui est également exprimé dans plusieurs régions impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus mais aussi du tronc cérébral (Bruzzone et al 2007, Kampe et al 2006).

2.1.1.2. Les neurones anorexigènes

- Les neurones à mélanocortine : POMC

La pro-opiomélanocortine est un précurseur qui après clivage mène à la production de plusieurs peptides. Parmi ces peptides la mélanotropine (ou mélanocortine), α -MSH, a été décrite comme ayant un puissant effet anorexigène lorsque administrée en i.c.v. (Fan et al 1997). L' α -MSH est exprimée au niveau de l'ARC et du NTS au sein du système nerveux central (Dube et al 1978 , Pelletier and Dube 1977). Les effets de l' α -MSH sont relayés par les récepteurs MC3 et MC4 présents au niveau de l'hypothalamus (Oosterom et al 1999). Les délétions des gènes de la POMC, MC3R ou MC4R entraînent l'obésité (Huszar et al 1997 , Yaswen et al 1999) chez la souris suggérant que la signalisation mélanocortine est importante pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Les souris déficientes pour les deux récepteurs MC3R et MC4R présentent une augmentation de leur masse corporelle plus importante que celle observée chez les souris déficientes pour un seul des deux récepteurs (Chen et al 2000) suggérant des effets additifs de ces récepteurs. Le même phénotype est observé chez les souris déficientes sélectivement en POMC d'origine centrale (Smart et al 2006). Chez l'homme, des mutations (Farooqi et al 2003, Yeo et al 1998) dans le gène du récepteur MC4R sont la cause de 5% des cas d'obésité sévère (Hinney et al 2003, Vaisse et al 2000). Des souris mâles qui ont un déficit sélectif en β -endorphine (mais une signalisation mélanocortine normale) présentent également une obésité (Appleyard et al 2003) suggérant une implication de ce peptide dérivé de la POMC dans la régulation de la prise alimentaire complémentaire de celui de l' α -MSH.

- Les neurones à CART « Cocaïne Amphetamine Related Transcript »

Le peptide CART est initialement identifié comme étant régulé positivement à la suite d'une administration de cocaïne et/ou d'amphétamine (Kuhar and Dall Vechia 1999). L'administration centrale de CART chez le rongeur provoque la diminution de la prise alimentaire alors que l'infusion d'un anticorps anti-CART conduit à l'effet opposé (Lambert et al 1998). De plus les souris obèses déficientes en leptine présentent une diminution de l'expression de CART (Kristensen et al 1998, Vettor et al 2002). 90% des neurones à CART sont co-localisés avec la POMC au niveau du noyau ARC et 95% des neurones à CART sont co-localisés avec la MCH au niveau de la LHA (Broberger 1999, Elias et al 1998). Les souris déficientes en CART développent une obésité due à une augmentation de la prise alimentaire sous régime riche en graisse (Asnicar et al 2001) et une mutation du gène codant pour le CART chez l'homme a été liée à une obésité sévère ainsi qu'à une réduction de la dépense énergétique (Yanik et al 2006). Cependant des études montrent que l'administration de CART directement au niveau de l'hypothalamus conduit à l'augmentation de la prise alimentaire (Abbott et al 2001) suggérant qu'il existe plusieurs sous populations de neurones à CART avec des effets physiologiques différentiels. Il est à noter que CART et POMC ne sont pas colocalisés chez l'Homme (Menyhert et al 2007).

- Les neurones à corticolibérine : CRH

L'administration centrale de CRH induit une inhibition de la prise alimentaire et une réduction de la masse corporelle chez le rat (Heinrichs and Richard 1999). Chez l'homme, l'administration périphérique de CRH provoque une augmentation de la dépense énergétique et de l'oxydation des lipides (Smith et al 2001). L'expression de la CRH est particulièrement abondante au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Venihaki and Majzoub 1999) et est réduite à la suite d'un jeûne (Schwartz et al 2000). La CRH exerce ses effets par le biais de deux récepteurs, CRH-R1 et CRH-R2, qui sont largement distribués au sein du système nerveux central (Richard et al 2000). Néanmoins, les animaux déficients en CRH comme en CRH-R1 et/ou CRH-R2 ne présentent pas de modification de la quantité de nourriture ingérée sur 24h (Muller et al 2000, Venihaki and Majzoub 1999) bien que le rythme circadien de cette prise alimentaire soit différent avec une augmentation de la prise alimentaire en période diurne (Muller et al 2000). Il est à noter que la libération de CRH suit également un rythme circadien avec un maximum en phase diurne et une chute de la libération en phase nocturne (Kwak et al 1992).

- Les neurones à thyroïdolibérine : TRH

L'administration centrale de TRH provoque une réduction de la prise alimentaire et de boisson chez le rat (Vettor et al 2002). L'expression de TRH au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est stimulée par α -MSH et inhibée par le NPY ou l'AgRP (Fekete et al 2004, Harfstrand et al 1986).

2.1.1.3. Le rôle des neurotransmetteurs

Alors que la majorité des recherches se concentre sur le rôle des neuropeptides dans le comportement alimentaire, il ne faut pas oublier que le mode de communication clé entre les neurones se fait par le biais des neurotransmetteurs que ce soit au niveau de l'hypothalamus ou dans le reste du système nerveux central. Ainsi l'activation des récepteurs NMDA au niveau de la LHA stimule la prise alimentaire (Stanley et al 1993) alors que l'infusion locale d'un antagoniste NMDA bloque la prise alimentaire induite par l'agoniste (Stanley et al 1996) suggérant un rôle important du signal glutamatergique dans le contrôle du comportement alimentaire. De plus, des données anatomiques au niveau du noyau ARC suggèrent que les neurones à NPY contiennent majoritairement du GABA alors que les neurones à POMC signal plutôt via le glutamate (Collin et al 2003, Horvath et al 1997). Ainsi, une étude récente rapporte que l'anorexie chez les souris délétées de leurs neurones à NPY/AgRP à l'âge adulte serait due à la perte du signal GABA sur les neurones de second ordre (Wu et al 2009). Cette observation est confirmée par une étude utilisant l'optogénétique pour stimuler spécifiquement les neurones à POMC ou AgRP et dans laquelle la stimulation aigue des neurones à AgRP conduit à une augmentation de la prise alimentaire conséquence d'un signal GABAergique sur les neurones de second ordre anorexigènes des noyaux paraventriculaire ou parabrachial (Aponte et al 2011, Williams and Elmquist 2011). Ainsi la régulation à court terme de la prise alimentaire par les neurones à NPY/AgRP pourrait passer par le GABA plutôt que par une action antagoniste sur la signalisation mélanocortine.

2.1.2. Le complexe Vagal Dorsal (CVD)

Le tronc cérébral offre une porte d'entrée au niveau du système nerveux central pour les signaux neurosensoriels. Plus récemment des études ont également montré que le tronc cérébral pouvait intégrer beaucoup de signaux qui ont également pour cible l'hypothalamus. L'exemple le plus marquant étant celui de la leptine. La stimulation sélective des récepteurs à la leptine au niveau du tronc cérébral entraine la suppression de la prise alimentaire à des doses comparables à celles utilisées au niveau de l'hypothalamus (Grill et al 2002, Hosoi et al 2002).

Le CVD est composé de trois régions : l'area postrema (AP), le NTS et le noyau dorso-moteur du nerf vague (DMV). L'AP est un organe circumventriculaire qui permet donc le passage de signaux provenant de la circulation générale. Ainsi le CVD reçoit aussi bien des informations humorales que neurosensorielles puisque les fibres afférentes du nerf vague arrivent au niveau de cette région (Figure 8).

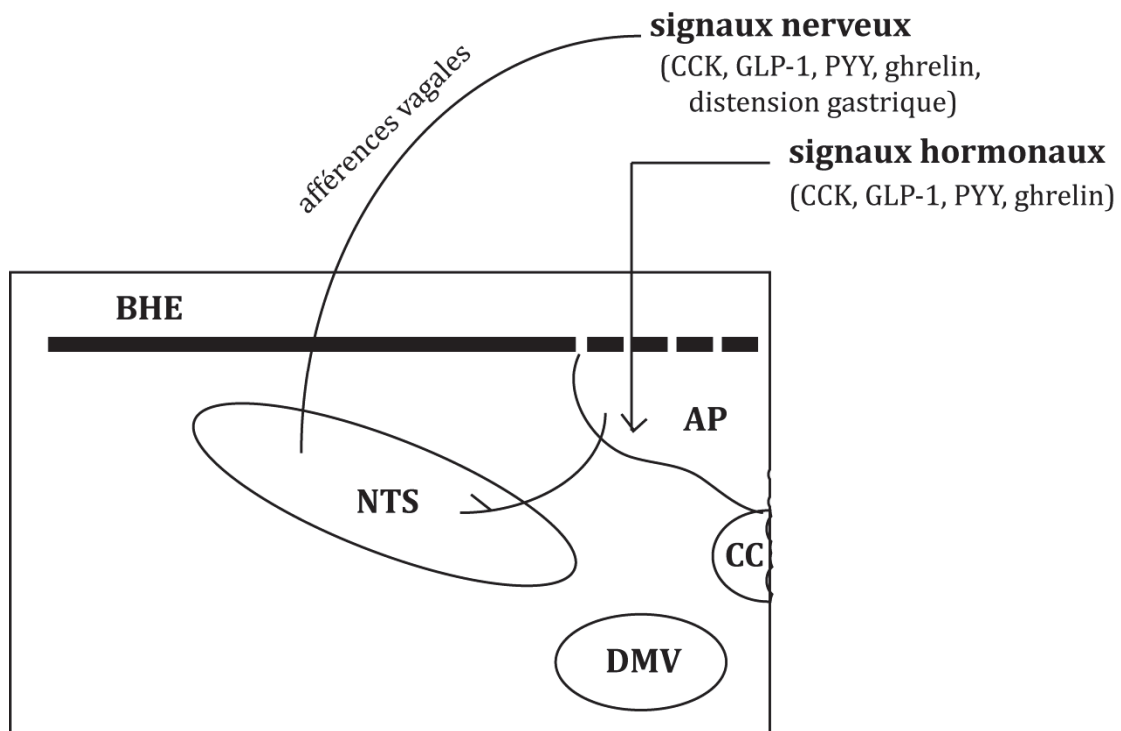


Figure 8 : Représentation schématique du complexe vagal dorsal (CVD)

Le CVD reçoit des informations humorales via l'area postrema (AP), organe circumventriculaire, ainsi que des signaux nerveux via les afférences vagales. BHE : barrière hémato-encéphalique, AP : area postrema, NTS : noyau du tractus solitaire, DMV : noyau dorso-moteur du vague, CC : canal central.

Le NTS intègre des signaux régulant l'homéostasie énergétique à court et à long terme. Ainsi la même région du NTS est la cible des signaux issus de la distension gastrique et de la leptine. De plus certains des neurones à POMC du NTS reçoivent des signaux viscéro-sensoriels (Appleyard 2005, Broglio et al 2004a, Fan et al 2004) suggérant un dialogue entre les signaux neurosensoriels et le système mélanocortine pour la terminaison des repas. Parallèlement, des neurones gluco-sensibles ont été trouvés au niveau du NTS (Mizuno and Oomura 1984) ainsi que des neurones répondant à la ghréline (Faulconbridge et al 2008). Tous ces résultats suggèrent que le NTS n'est pas uniquement la cible de signaux viscéro-sensoriel et intègre également beaucoup d'informations sur l'état métabolique de l'organisme.

2.2. Le contrôle non homéostasique de la prise alimentaire : le système de récompense

La prise alimentaire liée à un contrôle de l'homéostasie énergétique résulte d'une diminution des réserves énergétiques de l'organisme. Mais la prise alimentaire implique également des notions de plaisir et de récompense indépendamment de l'état des réserves énergétiques disponibles.

La notion de récompense liée à la prise alimentaire est tout d'abord générée au niveau des récepteurs du goût et des neurones situés sur les fibres afférentes arrivant au NTS. Au niveau central, le circuit de la récompense implique la libération de dopamine au niveau de neurones de la VTA qui projettent vers des régions plus rostrales et notamment le noyau accumbens (Kelley et al 2005) (Figure 9). Depuis le noyau accumbens des projections vers la LHA ont également été impliquées dans la stimulation de la consommation d'aliments palatables. La LHA comprend des neurones impliqués dans la stimulation de la prise alimentaire dont la levée de l'inhibition due à l'activation du circuit de récompense conduit à l'augmentation de la prise alimentaire (Kelley et al 2005). Parallèlement, elle reçoit des projections depuis le noyau ARC qui a un rôle clé, comme vu précédemment, dans le maintien de l'homéostasie énergétique faisant de cette région un centre de dialogue entre les signaux issus du système de récompense et du contrôle de l'équilibre homéostatique (Figure 9).

Le système de récompense est ainsi soumis au contrôle des signaux régulant l'homéostasie énergétique. La restriction en nourriture, augmente la valeur de la récompense associée à la consommation de drogues (Carroll et al 1979, Stuber et al 2002). L'insuline et la leptine sont suggérées comme faisant le lien entre la régulation de l'homéostasie énergétique et le circuit de récompense. La diminution de la concentration de ces deux hormones suite à une restriction calorique ou un jeûne entraîne une levée de l'inhibition exercée par ces hormones sur le système de récompense (Figlewicz et al 2004, Fulton et al 2000). Ainsi, l'administration centrale d'insuline ou de leptine conduit à la diminution de la préférence pour le sucrose (Figlewicz et al 2004) et à la diminution des effets du système de récompense induits par le jeûne (Fulton et al 2000). Au niveau cellulaire, l'insuline et la leptine contribuent à l'augmentation de la recapture de dopamine au niveau de la VTA ce qui entraîne une diminution du taux de dopamine synaptique au niveau du noyau accumbens (Figlewicz 2003).

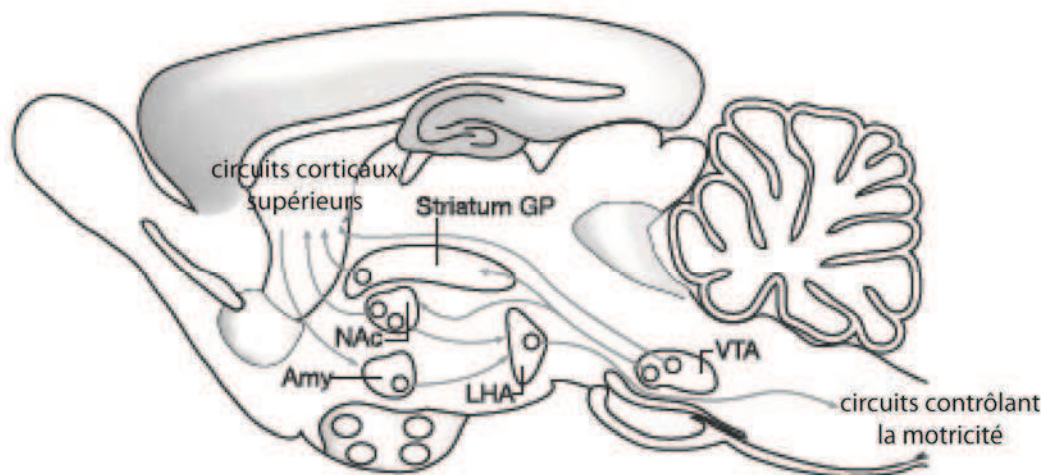
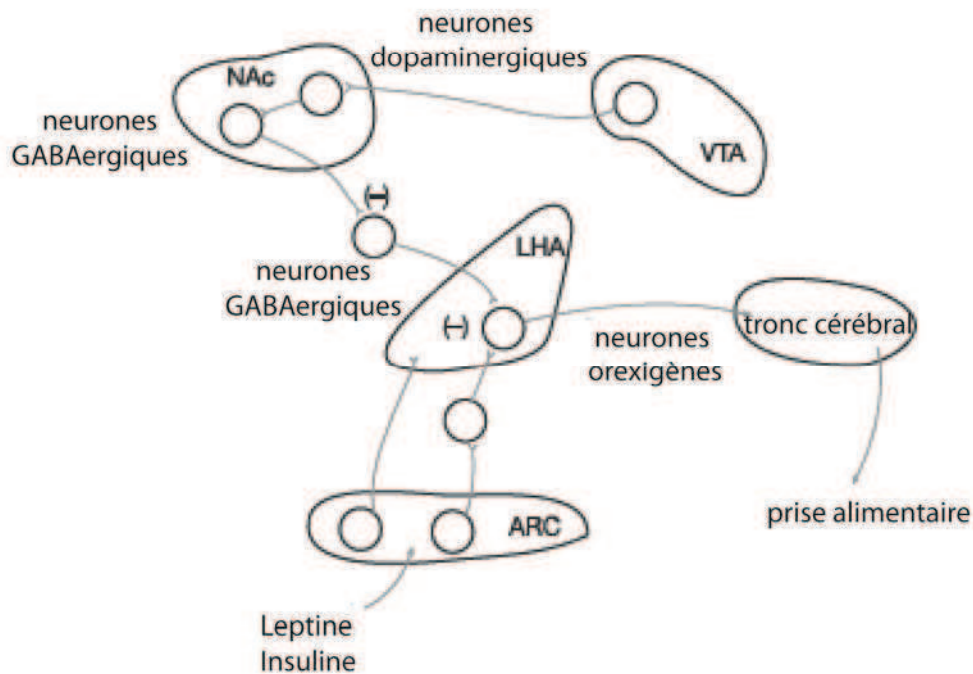
A**B**

Figure 9 : Modèle d'intégration des signaux liés à la récompense et des signaux d'adiposité. (D'après Morton et al 2006)

- Le circuit de la récompense comprend les neurones de la VTA qui projettent vers le prosencéphale et notamment vers le noyau accumbens, le striatum et le cortex.
- Un dialogue existe entre le circuit de la récompense et le circuit intégrant les informations sur l'homéostasie énergétique (i.e. les signaux d'adiposité : leptine et insuline). L'activation du noyau accumbens entraîne une désinhibition de la LHA et la prise alimentaire.

VTA : ventral tegmental area, NAc : noyau accumbens, Amy : Amygdale, LHA : aire hypothalamique latérale, ARC : noyau arqué.

Partie 3 : Les peptides dérivés de la préproghréline

1. Structure, formes et synthèse des peptides dérivés de la préproghréline

La préproghréline est un précurseur de 117 acides aminés qui par épissage alternatif (Seim et al 2007) ou après clivage protéolytique par les enzymes convertases (PC1/3) (Hosoda et al 2003) mène à la production de 2 principaux peptides : la ghréline et l'obestatine (Gualillo et al 2006). (Figure 10) Le gène de la préproghréline a été cloné chez différentes espèces telles que l'homme, le rat, le poulet, la grenouille ou encore le poisson et est relativement bien conservé particulièrement chez les mammifères.

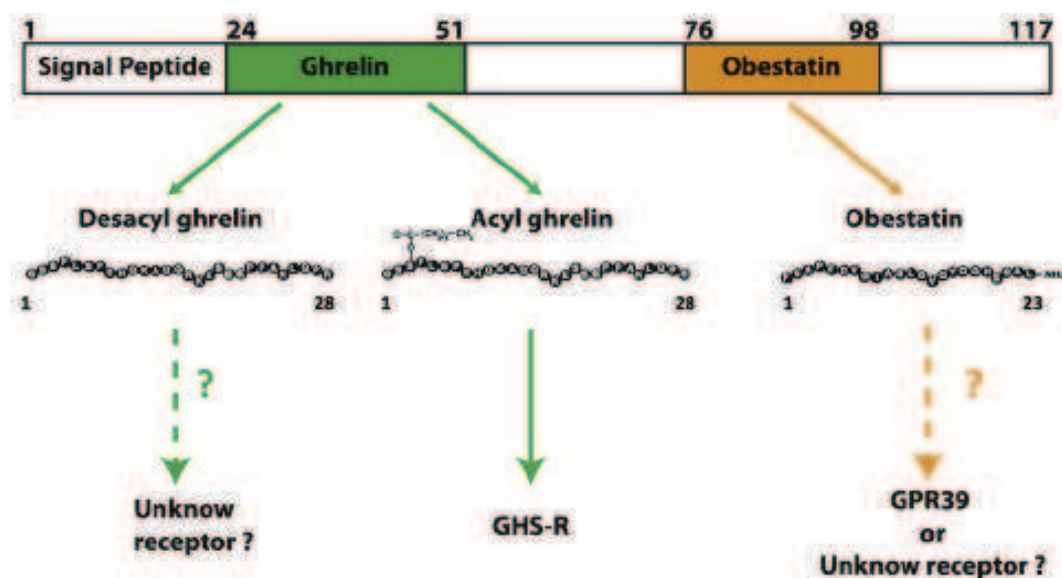


Figure 10 : Schéma représentatif de la structure de la préproghréline et de ses peptides dérivés.

La ghréline exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire du GHSR-1a. Les récepteurs relayant les effets de la ghréline non acylée et de l'obestatine ne sont pas connus. (D'après Zizzari et al 2011).

1.1. La ghréline

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés produit principalement au niveau de la muqueuse de l'estomac par les cellules X/A-like (Sakata et al 2002) ainsi que tout le long rostro-caudal du tractus gastro-intestinal avec des taux décroissant (Date et al 2000). Ainsi, les patients ayant subi une chirurgie bariatrique présentent une diminution de 76% de leur taux de ghréline plasmatique en comparaison avec des patients contrôles (Leonetti et al 2003). Une expression de la ghréline au niveau central ne peut être totalement exclue

comme le montre une étude par immunohistochimie dans laquelle une immunoréactivité ghréline est retrouvée au niveau des corps cellulaires et des axones de neurones situés au niveau des noyaux ARC, PVN, DMH et VMH (Cowley et al 2003). La structure de la ghréline est très conservée suggérant l'importance de son rôle physiologique. Chez le rat et la souris, la ghréline est identique et diffère de la forme humaine de seulement 2 acides aminés (Smith et al 1999, van der Lely et al 2004).

Le peptide de 28 acides aminés subit une modification post traductionnelle avec l'ajout d'un acide gras à 8 carbones sur la sérine en position 3 et l'ajout d'un acide gras à 10 carbones a été décrit chez l'homme (Hosoda et al 2003). L'enzyme responsable de l'acylation de la ghréline appartient à la famille des MBOAT (membrane-bound-O-acyltransférases) et a été appelée ghrelin-O-acyltransferase ou GOAT. Comme la ghréline, la GOAT est largement distribuée mais elle est majoritairement retrouvée au niveau de l'estomac et colocalise avec la ghréline au niveau du tractus gastro-intestinal (Gutierrez et al 2008, Yang et al 2008). La ghréline acylée a été initialement décrite comme le ligand endogène du récepteur aux GH sécrétagogues (GHS-R 1a) (Kojima et al 1999, Tomasetto et al 2000). Dès les années 80 commence la synthèse de peptides dérivés de la métenképhaline et capables de stimuler la sécrétion de GH à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi en 1984 est synthétisé le GHRP-6 (GH-releasing peptide 6) (Bowers et al 1984) c'est le premier composé, ayant perdu son activité d'opiacé, d'une famille que l'on nommera les GH sécrétagogues et qui ont tous pour récepteur le GHS-R. Le clonage du GHS-R est intervenue quelques années avant celle de la ghréline à partir d'hypophyse de porc (Howard et al 1996) et a conduit à l'isolation de cette dernière par Kojima et collaborateurs par une méthodologie de pharmacologie inverse (Kojima et al 1999). L'octanoylation de la ghréline est nécessaire pour sa fixation sur le GHS-R 1a et son activation (Bednarek et al 2000).

Le GHS-R 1a est composé de 366 acides aminés, c'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Howard et al 1996). Le gène du GHSR conduit à la production d'une autre forme du récepteur, le GHS-R 1b, par épissage alternatif. Le rôle du GHS-R 1b n'est pas bien déterminé, il pourrait jouer un rôle dans la régulation de la signalisation du GHSR-1a et l'accès de ce dernier à la membrane plasmique (Chow et al 2011). Au niveau de l'hypophyse, la fixation de la ghréline sur le GHS-R1a active la phospholipase C (PLC) qui mène à l'activation d'inositol-tri-phosphate (IP3) qui permet la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC mène à l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants (Adams et al 1998, Herrington and Hille 1994, Howard et al 1996). (Figure 11) L'activation du GHS-R 1a peut également mener à l'activation de l'AMPK ou à la voie des kinases associées aux mitochondries (MAPK).

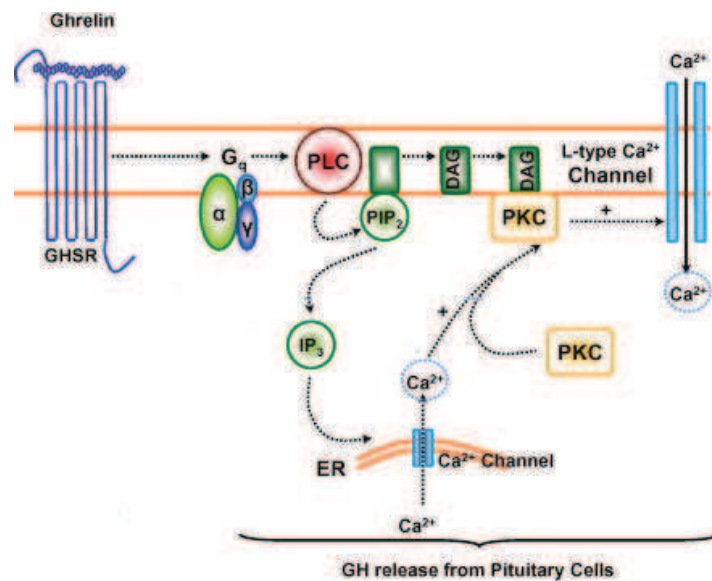


Figure 11 : Représentation schématique de la signalisation du GHS-R1a au niveau de la cellule somatotrope

La liaison de la ghréline à son récepteur permet le recrutement d'une protéine Gq et l'activation de la PLC (phospholipase C), qui mène à la génération d'IP3 (inositol tri-phosphate) et la libération de calcium intracellulaire. Le calcium libéré permet l'activation de la PKC (protéine kinase C) et l'ouverture des canaux calciques et ainsi un influx de calcium au sein de la cellule. ER : réticulum endoplasmique, DAG : diacyl-glycérol. (D'après Castañeda et al 2009).

Le GHS-R 1a est exprimé au niveau périphérique comme au niveau central (Muccioli et al 2001, Smith et al 1999, Zigman et al 2006) dans des structures impliquées dans la régulation de la sécrétion de la GH notamment au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Tableau 2). Au niveau du système nerveux central, le GHS-R 1a est largement distribué, il est présent dans des régions comme l'hippocampe, la VTA ou le noyau du raphé (Tableau 2). Suivant les études au niveau du noyau ARC 16 à 97% des neurones à NPY du noyau ARC co-expriment le GHS-R 1a, c'est le cas également de 20 à 27% des neurones à GHRH et au niveau du paraventriculaire 6 à 30% des neurones à SRIH co-expriment le GHS-R 1a (Tannenbaum 2003, Willeesen et al 1999).

Région		Fonctions associées décrites
Rat	Souris	
NTS	NTS	Contrôle de la pression artérielle
AP	AP	
DMV	DMV	
ARC	ARC	Contrôle de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH
DMH	DMH	Contrôle de la prise alimentaire
VMH		
PVN	PVN	
Noyau suprachiasmatique	Noyau suprachiasmatique	Contrôle de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH
VTA	VTA	Circuit de la récompense
Substance noire		Contrôle de la motricité
Hippocampe (Gyrus denté)		Mémoire et apprentissage
Noyaux mammillaires latéraux		Vigilance ?
Noyau supraoptique		Reproduction ?
Thalamus		?
Afférences vagues		Contrôle de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH
Adénohypophyse		Sécrétion des hormones hypophysaires

Tableau 2 : Localisation de l'expression du GHS-R1a et fonctions associées.

Lin et al 2004, Dickson et al 1997, Rüter et al 2003, Guan et al 2007, Yi et al 2008, Jerlhag et al 2007, Carlini et al 2002, Naleid et al 2005, Abizaid et al 2006, Date et al 2002, Reichenbach et al 2012.

La ghréline non acylée n'a pas de récepteur identifié cependant elle représente la forme majoritaire de ghréline circulante (Akamizu et al 2005, Hosoda et al 2000), ainsi la ghréline acylée ne représente que 20% de la ghréline circulante totale. L'administration de ghréline acylée exogène a permis d'établir que sa demie vie est d'environ 10 min alors que celle de la ghréline non acylée est d'environ 30 min (Nagaya et al 2001, Tolle et al 2002, Vestergaard et al 2008a) ce qui peut en partie expliquer les différences de concentrations observées dans la circulation. De plus, la majorité de la ghréline acylée circulante est liée à des protéines de liaison, notamment des lipoprotéines, alors que la forme non acylée ne l'est pas (Beaumont et al 2003, De Vriese et al 2007, Patterson 2005) et le groupement octanoyl est rapidement dégradé par la lysophospholipase 1 ou acyl protein thioesterase (APT 1) chez le rongeur et la butyrylcholinestérase chez l'homme (Satou et al 2010, Shanado et al 2004) ce qui influence aussi la balance plasmatique entre ghréline acylée et non acylée.

1.2. L'obestatine

L'obestatine a été identifiée quelques années après la ghréline, elle est issue du clivage de la partie C-terminale de la préproghréline (Zhang 2005). C'est un peptide de 23 acides aminés majoritairement synthétisé dans l'estomac et dans une moindre mesure au sein du reste du tractus gastro-intestinal, la rate et le cortex cérébral. Initialement décrite comme étant le ligand du récepteur jusque-là orphelin, le GPR39 (Moechars et al 2006 , Zhang 2005) ce résultat est aujourd'hui largement controversé (Chartrel et al 2007 , Holst et al 2006 , Lauwers et al 2006). La demi-vie de l'obestatine mesurée après administration de peptide exogène chez le rat est de 20 minutes (Zizzari et al 2007).

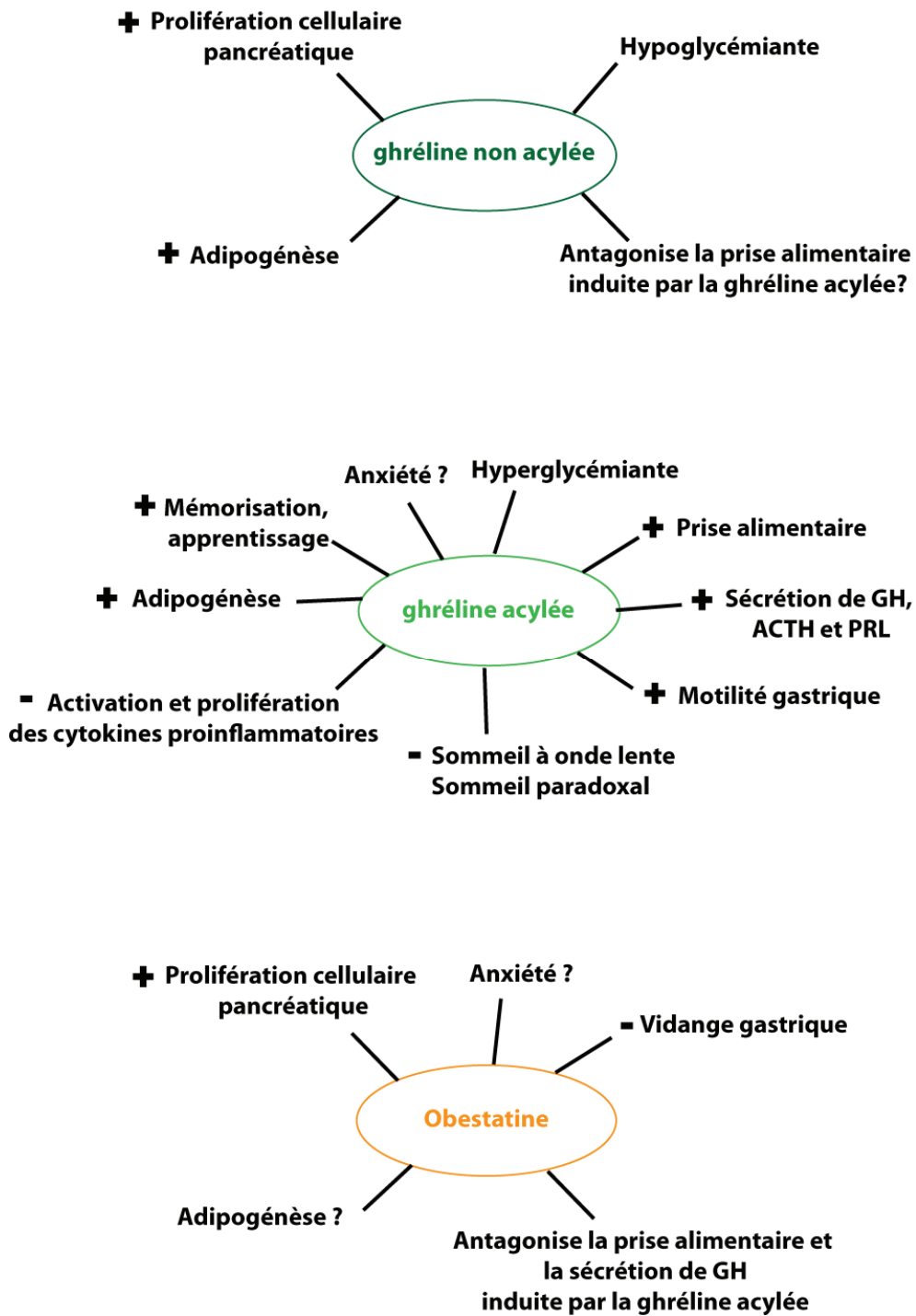


Figure 12 : Fonctions pléiotropes des peptides dérivés de la préproghréline

2. Fonctions des peptides dérivés de la préproghréline

Les peptides dérivés de la préproghréline ont des rôles divers. Les rôles de la ghréline acylée sont les mieux décrits et indiquent que ce peptide est une hormone pléiotrope. (Figure 12)

2.1. Action sur la sécrétion de l'hormone de croissance

Le premier effet décrit de la ghréline acylée a été son effet stimulateur de la sécrétion de la GH qu'elle exerce par le biais du GHS-R 1a (Kojima et al 1999). Lorsque la ghréline acylée est injectée en périphérie, elle agit directement au niveau hypophysaire en se liant à son récepteur exprimé par les cellules somatotropes pour stimuler la sécrétion de GH (Arvat et al 2000, Kojima et al 1999). Lorsque la ghréline est injectée en i.c.v. elle agit au niveau des neurones à GHRH du noyau ARC pour en stimuler la libération. Cet effet est confirmé par une expérience d'immunisation passive avec un anticorps anti-GHRH qui supprime les effets de la ghréline (Tannenbaum 2003) et par le fait que la ghréline stimule la libération de GHRH à partir d'explants hypothalamiques (Wren et al 2002). Plus récemment deux études ont montré une action stimulatrice de la ghréline sur la décharge des neurones à GHRH (Feng et al 2011, Osterstock et al 2010). Contrairement à la GHRH, la ghréline stimule la sécrétion de GH que ce soit dans les moments de pics ou de creux de libération de GH et quel que soit le tonus somatostatinergique (Tannenbaum 2003, Tolle et al 2001). De plus la ghréline stimule également la sécrétion de GH de façon plus indirecte en inhibant la libération hypothalamique de SRIH (Date et al 2002a, Tolle et al 2001). L'activité stimulatrice des GH sécrétagogues sur la sécrétion de GH est plus importante sur des préparation hypothalamo-hypophysaires que sur des hypophyses seules (Bowers et al 1991, Clark et al 1989, Malozowski et al 1991) ce qui est confirmé par une étude montrant que la ghréline stimule la sécrétion de GH *in vivo* d'un facteur plus de deux fois plus important qu'*in vitro* (Tolle et al 2001). De plus au niveau hypothalamique, la ghréline acylée active dans un deuxième temps les neurones à NPY qui eux même ont une action stimulatrice de la libération de SRIH (Rettori et al 1990) (Figure 13). Enfin, la relation entre le rythme de sécrétion de GH et celui de la ghréline n'est pas clairement établie (Tolle et al 2002) suggérant que la ghréline module l'amplitude des pics de GH plutôt que la genèse de sa sécrétion pulsatile. Ce résultat est confirmé par une étude dans laquelle l'utilisation d'un antagoniste spécifique du GHS-R1a mène à la diminution de l'amplitude des pics sécrétoires sans affecter la fréquence de ces pics chez le rat (Zizzari et al 2005) et par une étude qui abouti à l'observation du même phénomène à la suite d'un jeûne chez l'homme (Nass et al 2008).

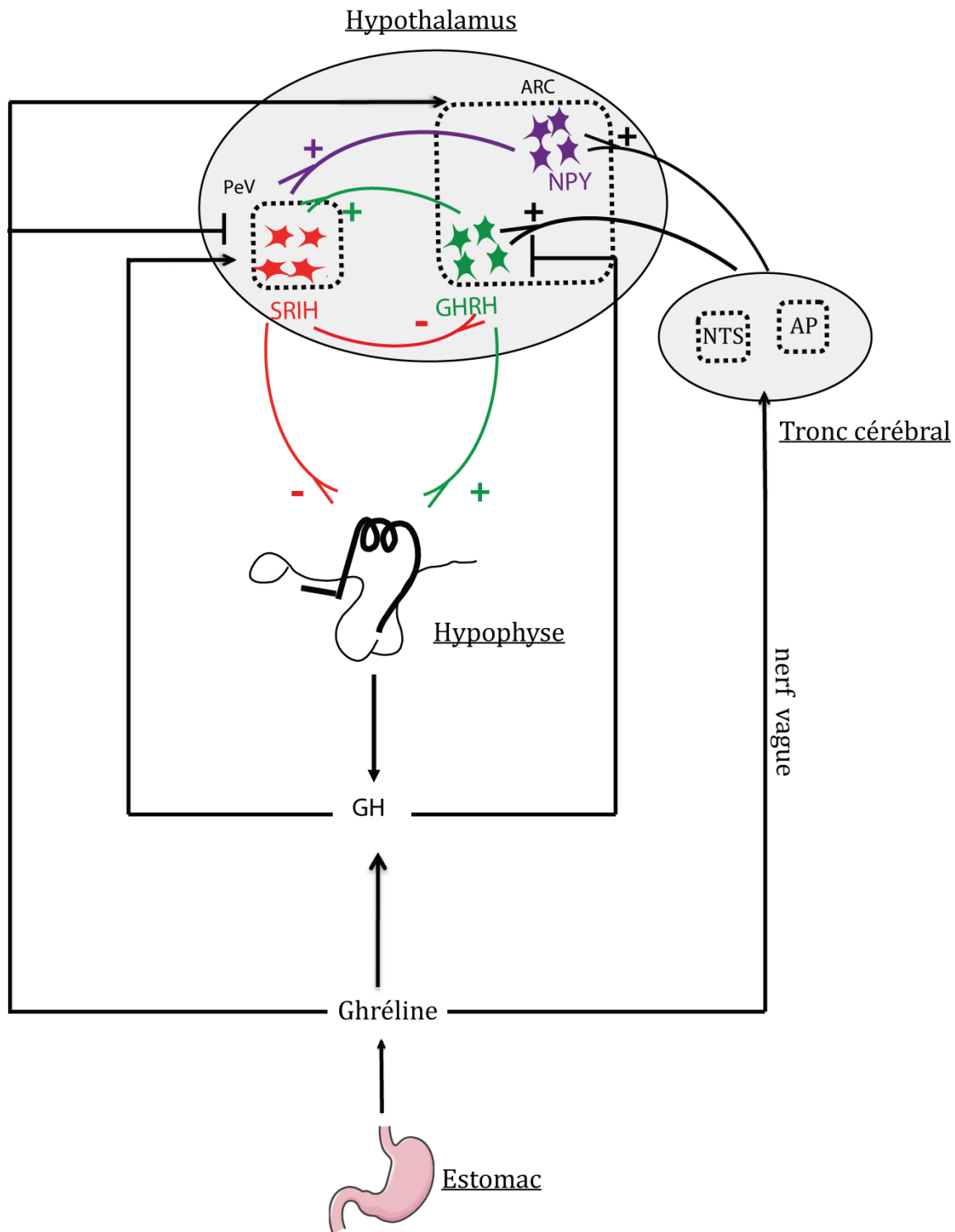


Figure 13 : Représentation schématique de l'implication de la ghréline dans le contrôle de la sécrétion de GH. (D'après Wagner et al 2009)

Les flèches et les + représentent les actions stimulatrices et les barres et les - représentent les actions inhibitrices. GHRH: growth hormone releasing peptide, SRIH: somatostatine, NPY: neuropeptide Y, AgRP: agouti-related peptide, GH: growth hormone, ARC: noyau arqué, AP: area postrema, NTS: noyau du tractus solitaire

Aucun effet propre de la ghréline non acylée n'a été montré concernant la sécrétion de GH cependant des souris transgéniques surexprimant la ghréline non acylée ont une modeste réduction de leur taille (Ariyasu et al 2005).

Bien que n'ayant pas d'effet propre sur la sécrétion de GH (Bresciani et al 2006 , Yamamoto et al 2007), chez le rat, l'obestatine antagonise l'augmentation de la sécrétion de GH induite par la ghréline lorsque ces deux peptides sont administrés dans des proportions équimolaires (Zizzari et al 2007). L'action inhibitrice de l'obestatine sur les effets de la ghréline sur la sécrétion de GH ne se fait pas au niveau de l'hypophyse (Zhang 2005 , Zizzari et al 2007) et au niveau de l'hypothalamus les régions qui pourraient être les cibles de l'obestatine sont mal connues. Cependant l'obestatine antagonise l'inhibition de la transmission synaptique de GABA induite par la ghréline sur les neurones à GHRH (Feng et al 2011).

2.2. Action sur le contrôle du comportement alimentaire

En plus de son action en faveur de la sécrétion de GH, la ghréline acylée exerce un fort effet orexigène après une injection aigue (Tschop et al 2000), c'est le seul peptide orexigène du tractus gastro-intestinal. La ghréline acylée exerce cet effet stimulateur de la prise alimentaire en activant les neurones à NPY/AgRP (Kamegai et al 2001 , Nakazato et al 2001 , Shintani et al 2001) par le biais de son récepteur, le GHS-R 1a (Sun et al 2004). L'action orexigène de la ghréline acylée est indépendante de la GH, cet effet étant toujours observé chez les animaux déficients en GH (Tschop et al 2000). De plus, la ghréline acylée aurait un rôle dans l'initiation des repas (Cummings et al 2001 , Diéguez et al 2010) et les comportements liés à la recherche de nourriture tels que l'éveil ou l'activité (Cummings 2006). Enfin, une implication de la ghréline dans la prise alimentaire due à l'activation du système de récompense a également été montrée (Abizaid et al 2006 , Egecioglu et al 2010, Naleid et al 2005 , Perello et al 2010).

Les données concernant l'implication de la ghréline non acylée dans le contrôle de la prise alimentaires sont peu nombreuses. L'administration i.c.v. de ghréline non acylée n'a pas d'effet sur la prise alimentaire chez des rats nourris *ad libitum* mais que ce peptide diminue la prise alimentaire chez des rats privés de nourriture depuis 16h (Asakawa 2005). En outre, la ghréline non acylée n'a pas d'effet *per se* sur la prise alimentaire mais que co-administrée avec la ghréline acylée elle diminue les effets de cette dernière sur la prise alimentaire et l'activation neuronale dans le noyau ARC (Inhoff et al 2008).

Les résultats concernant l'effet de l'obestatine sur la prise alimentaire sont très contradictoires, sur un total de 20 études seules 5 ont reproduit l'effet anorexigène initialement mis en évidence par Zhang et collaborateurs (Zhang 2005), 15 autres études ne montrent aucun effet de l'obestatine concernant la prise alimentaire (Annemie et al 2009). L'obestatine semble toutefois avoir un effet modulateur des actions de la ghréline car

lorsqu'elle est co-administrée dans des proportions équimolaires avec la ghréline acylée, elle inhibe les effets orexigène de celle-ci (Zizzari et al 2007).

2.3. Action sur le contrôle du métabolisme énergétique

2.3.1. Action sur l'homéostasie glucidique

In vivo comme *in vitro* la ghréline acylée influence négativement la sécrétion d'insuline agissant directement au niveau du pancréas (Colombo et al 2003 , Egido et al 2002 , Reimer et al 2003) et stimule la sécrétion de glucagon (Chuang et al 2011 , Qader et al 2005). Ces effets de la ghréline acylée passent par l'activation du GHS-R 1a. En effet, les souris déficientes pour ce récepteur ont une glycémie plus basse ainsi qu'une réduction du taux de glucagon (Dezaki et al 2006) et l'administration d'un antagoniste du GHS-R 1a favorise la libération d'insuline induite par le glucose à partir de pancréas murins (Sun et al 2007). La ghréline acylée s'oppose à l'action de l'insuline en inhibant l'activité d'Akt, enzyme impliquée dans la cascade de signalisation de l'insuline, et stimule les enzymes clés de la néoglucogenèse au niveau des cellules hépatiques *in vitro* comme *in vivo* (Barazzoni et al 2007a, Murata et al 2002). Ainsi, la ghréline acylée a une action plutôt hyperglycémiant et induit des résistances à l'insuline au niveau du foie et du muscle squelettique (Broglia et al 2001 , Tong et al 2010).

La ghréline non acylée s'oppose aux effets de la ghréline acylée sur le pancréas chez l'homme comme chez le rongeur (Broglia et al 2004b , Gauna et al 2005 , Zhang et al 2008). De plus la ghréline non acylée exerce également un rôle au niveau hépatique où elle agit en faveur de la capture et du stockage du glucose à l'inverse de la ghréline acylée (Gauna et al 2005 , Heijboer et al 2006).

Concernant les effets de l'obestatine sur le métabolisme glucidique, il n'existe pas vraiment de données solides et des études plus poussées en ce sens seraient intéressantes.

Enfin, les trois peptides dérivés de la préproghréline possèdent une action directe au niveau du pancréas en faveur de la prolifération cellulaire (Granata et al 2008).

2.3.2. Action sur le métabolisme des lipides

La ghréline acylée a un pouvoir adipogène (Tschop et al 2000), cet effet a été démontré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Barazzoni et al 2005 , Choi et al 2003 , Wren et al 2001). L'administration de ghréline acylée à long terme entraîne une augmentation de la masse grasse aussi bien chez le rongeur que chez l'homme. Cependant, l'administration aiguë de ghréline acylée chez l'homme provoque une augmentation de la lipolyse probablement d'une manière indépendante de la GH qui est, elle, une hormone lipolytique (Vestergaard et al 2008b). L'effet adipogène de la ghréline acylée est fortement réduit chez les souris déficientes pour le GHS-R 1a suggérant que ce récepteur est nécessaire pour cette fonction de la ghréline acylée (Longo et al 2008 , Zigman et al 2005). La ghréline acylée agit

en faveur de l'accumulation de masse grasse qu'elle soit administrée au niveau central ou en périphérie. Au niveau central, elle agit en faveur de l'activation de l'AMPK (Andersson et al 2004, Kola et al 2005) et en périphérie elle stimule la lipoprotéine lipase, la fatty-acyl synthase et l'expression du facteur de transcription adipogénique PPAR γ (Buyse et al 2009). De plus au niveau des adipocytes, la ghréline acylée inhibe la lipolyse induite par la signalisation β -adrénergique (Baragli et al 2011, Muccioli et al 2004) ainsi que la libération de lipides (Rodriguez et al 2009).

Les données obtenues avec la ghréline non acylée montrent un effet adipogène identique à celui de la ghréline acylée mais indépendant du GHS-R1a (Baragli et al 2011, Muccioli et al 2004, Thompson et al 2004). Cet effet s'exerce directement au niveau du tissu adipeux, aussi bien chez le rongeur que chez l'homme, par le biais de l'inhibition de la lipolyse et de la stimulation de l'accumulation d'acides gras (Muccioli et al 2004, Rodriguez et al 2009).

Des études *in vitro* ont montré que l'obestatine agit également en faveur de l'augmentation de l'adiposité en réduisant la lipolyse et favorisant l'adipogenèse (Gurriarán-Rodríguez et al 2011, Miegueu et al 2011). Cependant *in vivo*, les résultats quant à l'action de l'obestatine sur le métabolisme des lipides sont contradictoires (Ren et al 2009, Seim et al 2011).

2.4. Autres actions

- Modulation de la sécrétion d'hormones hypophysaires

Outre sa capacité à stimuler la sécrétion de GH, la ghréline acylée module également la sécrétion de prolactine (PRL) et d'ACTH au niveau des cellules hypophysaires lactotropes et corticotropes respectivement et aussi bien chez l'homme que chez le rongeur (Cordido et al 2009, Kojima and Kangawa 2010)). Aucune étude ne décrit l'effet de la ghréline non acylée sur la sécrétion des hormones hypophysaires. L'administration d'obestatine qu'elle soit effectuée au niveau central ou périphérique n'affecte ni la sécrétion de PRL ni celle d'ACTH chez le rat (Bresciani et al 2006, Yamamoto et al 2007).

- Motricité gastro-intestinale

La structure primaire de la ghréline présente une homologie de séquence avec la motiline (Asakawa et al 2001, Tomasetto et al 2000) peptide ayant un rôle dans la motricité gastrique. Ainsi, des études ont montré l'implication de la ghréline dans la motilité gastro-intestinale (Masuda et al 2000). La ghréline administrée en i.v. ou en i.p. provoque l'accélération de la vidange gastrique en période postprandiale chez l'animal comme chez l'homme (Binn et al 2006, Levin et al 2006, Murray et al 2005). Cet effet de la ghréline passerait par le biais des afférences vagales qui projettent au niveau du NTS et serait par conséquent impliqué dans le phénomène de satiété (Fujino et al 2003). Les données concernant l'effet de l'obestatine sur la motilité du tractus gastro-intestinal sont contradictoires, certaines études montrent un effet inhibiteur de l'obestatine sur la motricité

et la vidange gastrique (Zhang 2005), alors que d'autres n'ont pas observé ces effets (De Smet et al 2007 , Gourcerol et al 2007).

- Immunité

La ghréline acylée est également impliquée dans la modulation de l'immunité où elle agit en faveur de la prolifération cellulaire des cellules T (Koo et al 2001) et inhibe l'activation et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires (Dixit et al 2004 , Li et al 2004). A l'inverse, la ghréline non acylée n'a pas d'influence sur le système immunitaire (Li et al 2004) et les effets de l'obestatine ne sont pas encore déterminés.

- Mémoire, anxiété et dépression

La ghréline a également un impact sur les processus de mémorisation, l'anxiété et la dépression. Ainsi, plusieurs études ont montré que la ghréline acylée augmente de façon dose dépendante les capacités de mémorisation et d'apprentissage (Carlini et al 2002 , Carlini et al 2007 , Toth et al 2009), il en va de même pour l'obestatine, qui favorise aussi la mémorisation (Carlini et al 2007) par contre aucun effet de la ghréline non acylée n'a été montré (Carlini et al 2002 , Weikel et al 2003). En ce qui concerne l'anxiété et la dépression, il semble que la ghréline exogène et endogène n'aient pas la même action. L'administration de ghréline exogène a un anxiogène (Carlini et al 2002 , Hansson et al 2011) alors que les modèles de souris déficientes en GHS-R 1a ou en ghréline montrent que la ghréline endogène a plutôt un effet anxiolytique d'après l'étude comportementale (avec de tests permettant de mesurer l'anxiété chez la souris) effectuée chez les souris déficientes pour le GHS-R1a ou la ghréline (Lutter et al 2008 , Spencer et al 2012). L'obestatine s'oppose aux effets de la ghréline en ce qui concerne l'anxiété (Carlini et al 2002).

- Modulation du sommeil et de l'éveil

La ghréline favorise le sommeil à ondes lentes chez l'homme (Weikel et al 2003) alors qu'elle entraîne une diminution de la durée du sommeil paradoxal aussi bien chez l'homme que chez le rongeur (Tolle et al 2002 , Weikel et al 2003). Chez le rat, la ghréline stimule l'éveil et réduit le sommeil à ondes lentes (Tolle et al 2002). L'obestatine promeut le sommeil uniquement lorsqu'elle est administrée directement au niveau du système nerveux central (Szentirmai and Krueger 2006).

2.5. Utilisation de la ghréline en clinique

Chez l'homme la ghréline stimule fortement la sécrétion de GH (Akamizu et al 2004, Arvat et al 2001 , Takaya et al 2000). La ghréline, comme les GH sécrétagogues synthétiques, pourraient se révéler être un outil thérapeutique intéressant dans le traitement des pathologies associées à un déficit en GH. Ainsi, chez des enfants de petite taille (Laron et al 1995) ou des enfants déficients en GH l'administration de GH sécrétagogues tels que l'hexareline ou le GHRP-2 permet l'augmentation des taux plasmatiques d'IGF-1 et la

croissance. Il en va de même chez de jeunes adultes chez lesquels l'administration de MK0677 entraîne une augmentation de la sécrétion de GH et des taux d'IGF-1 (Chapman et al 1997). Des essais avec la ghréline ou des GH sécrétagogues synthétiques pour le traitement de la cachexie ont rapporté des effets bénéfiques. Ainsi la ghréline rétablit une balance énergétique positive de façon dépendante ou indépendante de la GH chez des patients atteints de cachexie associée à des défauts cardiaques (Nagaya et al 2004, Nagaya and Kangawa 2006). En ce qui concerne l'anorexie mentale, l'utilité des traitements par la ghréline n'est pas encore prouvée. En effet, les études sur les effets de la ghréline sont encore très préliminaires et les résultats ne sont pas toujours concordants (Broglia et al 2004a , Hotta et al 2009, Miljic et al 2006).

3. Les modèles animaux : révélation des rôles des peptides endogènes dérivés de la préproghréline

3.1. Invalidation du GHSR

Aux vues des rôles exercés par la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire, des souris de plus petite taille et plus minces étaient attendues après l'invalidation de son récepteur, le GHSR. Cependant, les souris déficientes pour le GHSR, *ghsr* ^{-/-}, ne sont pas plus petites et leur comportement alimentaire est identique à celui des souris sauvages (Sun et al 2004). Elles présentent néanmoins une diminution modérée de leur masse corporelle et des taux d'IGF-1. L'administration de ghréline chez les souris *ghsr* ^{-/-} ne conduit ni à la stimulation de la sécrétion de GH ni à l'augmentation de la prise alimentaire. Ces résultats suggèrent que la ghréline exerce ses effets sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire par le biais du GHSR-1a *in vivo*.

Les souris *ghsr* ^{-/-} présentent une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses (HFD) lorsque celui-ci est démarré peu de temps après le sevrage (Zigman et al 2005) mais pas avec un régime démarré à l'âge adulte (Sun et al 2004). Ces données pourraient s'expliquer par la différence d'âge au début du régime HFD et suggérer que la ghréline aurait un rôle clé pendant la période de croissance rapide. Toutefois, ces différences pourraient également s'expliquer par la différence de fond génétique des souris *ghsr* ^{-/-} ou encore par des différences dans la composition en lipides des régimes HFD entre les deux études. Les souris de l'étude de Sun et collaborateurs étant sur fond génétique C57BL/6 et celles de Zigman et collaborateurs étant sur un fond génétique mixte (C57BL/6J : 129sv). Une étude plus récente a montré que les souris *ghsr* ^{-/-} sur fond génétique C57BL/6 ne présentaient pas de résistance à l'obésité induite par un régime HFD même lorsque ce dernier était administré très tôt (autour de 8 semaines) (Sun et al 2007). Parallèlement, l'exposition des souris *ghsr* ^{-/-} à un régime HFD aurait pour effet une meilleure tolérance au glucose de ces souris (Longo et al 2008).

Les souris *ghsr* $-/-$ comme les souris sauvages ont une diminution de leurs taux de leptine et d'insuline et présentent la même réponse à la re-nutrition suite à un jeûne de 24h (Sun et al 2004). Soumises à une restriction calorique de 50%, les souris *ghsr* $-/-$ présentent une diminution de leur masse corporelle, identique à celle des souris sauvages, mais accompagnée d'une hypoglycémie modérée (Sun et al 2007).

3.2. Invalidation de la GOAT

Les souris invalidées pour la GOAT, *goat* $-/-$, et par conséquent déficientes en ghréline acylée ne présentent pas de différence de taille, de masse corporelle ou adipeuse par comparaison aux souris sauvages lorsqu'elles sont nourries par un régime standard (Kirchner et al 2009). Une amélioration de la tolérance au glucose associée à une augmentation de la concentration plasmatique en insuline par rapport aux souris sauvages est trouvée chez les souris *goat* $-/-$ (Zhao et al 2010) suggérant que la ghréline acylée exerce un effet délétère sur le métabolisme glucidique.

Sous un régime riche en triglycérides à chaîne moyenne les souris *goat* $-/-$ présentent une baisse de la masse corporelle et de la masse grasse accompagnée d'une élévation de la dépense énergétique alors que la prise alimentaire est légèrement augmentée (Kirchner et al 2009). Dans la même étude, les souris soumises à un régime HFD classique (avec 60% des calories apportées par les lipides) présentent uniquement une résistance à l'obésité induite par le régime mais aucun changement de leur métabolisme énergétique.

Des résultats contradictoires existent en ce qui concerne le phénotype des souris *goat* $-/-$ soumises à une restriction calorique. Dans une première étude, une restriction calorique de 60% provoque une hypoglycémie sévère chez les souris *goat* $-/-$ comparée aux souris sauvages et si elle est prolongée, provoque la mort des souris (Zhao et al 2010) alors que dans une seconde étude elle ne conduit à aucune différence entre les deux génotypes (Yi et al 2012). Cette différence de résultats pourrait être expliquée par une composition différente en carbohydrates des deux régimes, un âge différent des souris (plus jeunes dans la première étude) ainsi que des fonds génétiques différents (mixte C57BL/6 :129sv pour la première et C57BL/6 pour la deuxième).

3.3. Invalidation de la ghréline

Le développement de souris déficientes en ghréline, *ghrl* $-/-$, a apporté de nouvelles données quant au rôle que pouvait exercer le peptide endogène. Tout comme les souris *ghsr* $-/-$, les souris *ghrl* $-/-$ ne présentent pas de réduction de leur taille ni de différence au niveau de leur prise alimentaire ou encore du rythme circadien de leur prise alimentaire lorsque comparées aux souris sauvages (De Smet 2005, Sun et al 2003, Wortley et al 2004). De plus l'expression des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (NPY, AgRP, POMC et MCH) n'est pas affectée chez les souris *ghrl* $-/-$.

Le régime HFD provoque une augmentation de la masse grasse chez les souris *ghrl*^{-/-} comme chez les souris sauvages (Sun et al 2003). Cette observation est confirmée par une seconde étude qui montre également une augmentation de la masse corporelle des souris *ghrl*^{-/-} sous HFD (Wortley et al 2004). De façon intéressante, cette étude montre également une diminution du quotient respiratoire des souris *ghrl*^{-/-} sous régime HFD comparées aux souris sauvages suggérant une utilisation préférentielle des lipides plutôt que des carbohydrates. De plus lorsque le régime HFD est débuté à un âge plus précoce, 3 semaines après le sevrage, les souris *ghrl*^{-/-} présentent une diminution de leur masse corporelle et de leur masse grasse associée à une augmentation de leur dépense énergétique et de leur activité locomotrice en comparaison avec les souris sauvages (Wortley et al 2005). Ces deux derniers résultats suggèrent un rôle de la ghréline dans la régulation du métabolisme énergétique notamment chez les jeunes souris ce qui concorde avec les observations effectuées chez les souris *ghsr*^{-/-} (Wortley et al 2005, Zigman et al 2005).

Après un jeûne, les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline des souris *ghrl*^{-/-} sont identiques à celles des souris sauvages, il en va de même pour leur prise alimentaire durant un jeûne de 24h et à l'arrêt de celui-ci (Sun et al 2003, Wortley et al 2004). Enfin, comme les souris *ghsr*^{-/-}, les souris *ghrl*^{-/-} soumises à une restriction calorique de 50% présentent une diminution de leur masse corporelle, identique à celle des souris sauvages, mais accompagnée d'une hypoglycémie modérée (Sun et al 2007).

Le rôle de la ghréline dans la régulation du métabolisme glucidique a également été exploré chez des souris *ob/ob*, déficientes en leptine chez lesquelles la ghréline a été supprimée (souris double knock-out, *ghrl*^{-/-};*ob/ob*). Chez ces souris obèses, l'absence de ghréline ne modifie pas la masse corporelle mais améliore la glycémie ainsi que la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Sun et al 2006). Ainsi la ghréline semble également impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique.

Ces différents modèles de souris génétiquement modifiées permettent l'étude des rôles des peptides dérivés de la préproghréline, de manière générale en ce qui concerne les souris *ghrl*^{-/-}, et plus spécifiquement le rôle de la ghréline acylée en ce qui concerne *goat*^{-/-} ou en core le rôle de la signalisation ghréline via le GHS-R1a pour les souris *ghsr*^{-/-}. C'est la synthèse des résultats obtenus avec ces différents modèles qui permettra de déterminer au mieux le rôle de la ghréline.

Tableau 3 : Comparaison entre les différents modèles de souris KO pour l'étude du rôle de la signalisation ghréline/GHS-R1a.

¹ souris dont l'âge est supérieur à 7 semaines, ² souris âgées de 4 à 7 semaines, HFD : régime riche en graisse, RC : restriction calorique, J : jeûne, ND : non déterminé, RQ : quotient respiratoire, MG : masse grasse.

	GHS-R KO			Ghrelin KO			GOAT KO		
Régime	Standard	HFD	RC/J	Standard	HFD	RC/J	Standard	HFD	RC/J
Paramètre observé									
Poids	↓	= ¹ ou ↑ ¹ id aux WT ²	↓ id aux WT	=	= ¹ ou ↑ ¹ id aux WT ²	↓ id aux WT	=	↓	↓
Taille	↓			=			=	=	
Concentration d'IGF-1	↓	ND	ND	=	ND	ND	ND	ND	ND
Prise alimentaire	= sur 24h	↓ ¹ ou ↑ ¹ id aux WT ²	=	= sur 24h	=	=	= sur 24h	= ¹ ou ↑ ²	
Glycémie	=		↓ id aux WT	=		↓ id aux WT	↓		↓↓
Insulinémie	=	↓ ¹ ou ↑ ²	↓ id aux WT	=		↓ id aux WT	↑		
%MG	=	=	ND	=	=	ND	=	= ¹ ou ↓ ²	↓
RQ	=	↓	ND	=		ND	ND	ND	ND
Dépense énergétique	=	ND	ND	=	= ¹ ou ↑ ²	ND	=	= ¹ ou ↑ ²	ND

4. Expression et sécrétion des peptides dérivés de la préproghréline

L'expression et la sécrétion des peptides dérivés de la préproghréline varient au cours du développement embryonnaire puis en période post-natal ainsi qu'à l'âge adulte.

4.1. Durant le développement

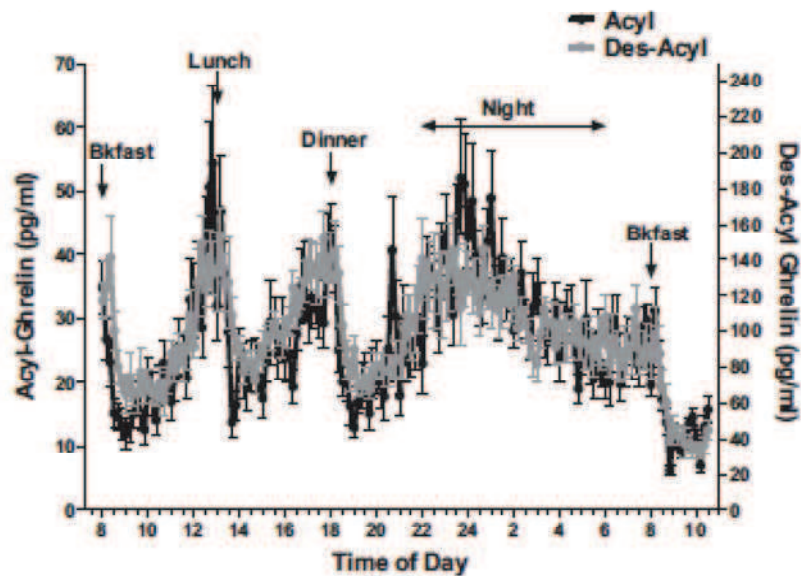
L'expression de la ghréline est détectée très tôt au cours du développement embryonnaire, dès le stade de morula (Kawamura et al 2003) et des niveaux significatifs de ghréline dans la circulation sont atteints chez l'embryon dès le dix-septième jour (E17) (Nakahara et al 2006 , Torsello et al 2003). Contrairement à l'adulte, chez le fœtus la source la plus importante de ghréline est le pancréas et non l'estomac (Chanoine and Wong 2004 , Wierup et al 2002). Ainsi au cours de la période périnatale, la ghréline est co-exprimée au niveau des cellules α des îlots de Langerhans pancréatiques (Date et al 2002b) mais elle est également exprimée au niveau de cellules ghréline spécifiques au sein du pancréas endocrine : les cellules ϵ (Prado et al 2004). L'expression de ghréline au niveau de l'estomac augmente petit à petit après la naissance pour atteindre le niveau observé à l'âge adulte autour de 3 à 5 semaines de vie (Hayashida et al 2002 , Torsello et al 2003). L'expression de la ghréline pancréatique suit le chemin opposé en diminuant progressivement de la naissance jusqu'à la puberté, période à partir de laquelle l'expression de ghréline est très faible au niveau de cet organe (Wierup et al 2002). La localisation de l'expression de la ghréline durant la période périnatale chez le rat suggère que la ghréline n'a pas tout à fait le même rôle qu'à l'âge adulte et ceci est confirmé par des études montrant que la ghréline exogène n'est capable d'induire la prise alimentaire qu'à partir de l'âge de 3 semaines (Piao et al 2008). Ainsi en période périnatale la ghréline aurait plutôt un rôle dans le développement de plusieurs organes comme le pancréas, le tractus gastro-intestinal ou encore le cerveau ainsi que dans la croissance (Chanoine 2005, Dembinski et al 2005 , Inoue et al 2010).

4.2. Chez l'adulte

Les concentrations plasmatiques de ghréline totale et acylée et non acylée augmentent en anticipation des repas chez l'homme puis diminuent rapidement en période postprandiale (Cummings et al 2001 , Liu et al 2008, Tschöp et al 2001a). Chez le rongeur, un schéma similaire est observé, avec une augmentation de l'expression de ghréline en période préprandiale et une baisse après les repas (Toshinai et al 2001). Chez le rat, une augmentation des concentrations circulantes de ghréline acylée en anticipation des repas spontanés (Zizzari et al 2011) et programmés (Verbaeys et al 2011) est observée. De plus, un pic de sécrétion de ghréline acylée au moment de la transition jour/nuit est observable et reproductible (Zizzari et al 2011). (Figure 14). L'augmentation de sécrétion de ghréline acylée suite à un jeûne est visible chez le rat dès la fin de la première semaine après la naissance (Hayashida et al 2002, Liu et al 2002). Ce schéma de sécrétion de la ghréline est concordant

avec son rôle dans le comportement alimentaire et notamment l'initiation des repas. Chez le rat, la ghréline acylée et l'obestatine sont sécrétées dans la circulation générale avec un rythme ultradien et les pics de sécrétion des deux peptides ont une fréquence similaire (Zizzari et al 2005).

A



B

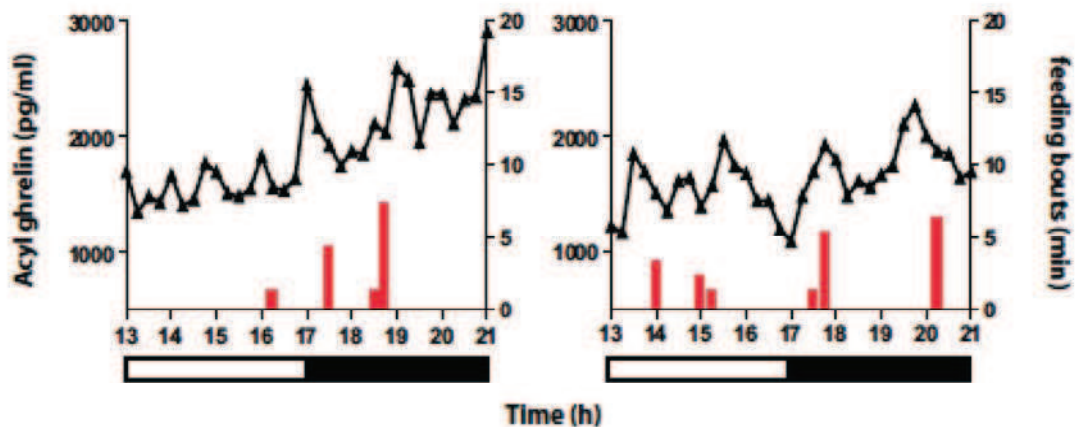


Figure 14 : Profils de sécrétion pulsatile de la ghréline

La ghréline est sécrétée de façon pulsatile au sein de la circulation générale et des pics de sécrétions sont observés en anticipation des repas.

A. Profil de sécrétion de la ghréline acylée et non acylée chez l'homme. Les moments de chacun des repas sont marqués par une flèche. (Liu et al 2008)

B. Profils de sécrétion de ghréline acylée et prise de nourriture chez deux rats. Les prises alimentaires sont représentées par des histogrammes rouges. (Zizzari et al 2011)

5. Régulation de la sécrétion des peptides dérivés de la préproghréline

Plusieurs études se sont intéressées aux variations dans les concentrations plasmatiques des peptides dérivés de la préproghréline notamment dans des conditions physiopathologiques notamment dans le cas de pathologies liées à des déséquilibres de la balance énergétique.

5.1. En situation de dénutrition

La cachexie est un état durant lequel se produit une perte de poids involontaire souvent liée à une autre pathologie. La perte d'appétit ou encore une mauvaise absorption et assimilation des nutriments contribuent à cet état. Plusieurs études se sont intéressées à la concentration plasmatique de ghreline chez des patients souffrant de cachexie. Toutes ces études ont rapporté une élévation de la concentration plasmatique de ghreline quelle que soit la pathologie associée à la cachexie (cancer, problèmes rénaux ou cardiaques ou encore pathologie du foie) (Nagaya et al 2001, Shimizu et al 2003, Tacke et al 2003). Plus précisément, la concentration de ghreline acylée ainsi que le ratio ghreline acylée sur ghreline totale sont augmentés et inversement corrélés à l'indice de masse corporelle (IMC). Paradoxalement, il semble que l'administration de ghreline ait un effet bénéfique sur la prise alimentaire de certains patients atteints de cachexie comme mentionné précédemment (Nagaya et al 2004, Nagaya and Kangawa 2006).

L'anorexie mentale est une pathologie caractérisée par une restriction de la prise alimentaire volontaire menant à un état de dénutrition majeur et à une forte diminution de la masse corporelle. Toutes les études qui se sont intéressées à cette pathologie ont décrit des concentrations plus élevées de ghreline acylée et totale chez les patientes atteintes d'anorexie mentale de type restrictif (AN-R) par rapport à des sujets sains contrôles (Monteleone et al 2008, Soriano-Guillén et al 2004, Tolle et al 2003, Zamrazilova et al 2008).

Ces changements de concentration de ghreline peuvent être interprétés comme un mécanisme adaptatif afin de compenser une balance énergétique négative. Parallèlement, la concentration plasmatique d'obestatine ainsi que le ratio ghreline sur obestatine ont été retrouvés diminués chez des patientes atteintes d'AN-R en comparaison avec des patientes constitutionnellement minces avec un IMC équivalent à celui des jeunes femmes anorexiques (Germain et al 2009, Germain et al 2010). Ainsi parmi tous les signaux pouvant contrer les effets orexigènes de la ghreline, l'obestatine est le seul à être augmenté chez les patientes atteintes d'AN-R, ce qui pourrait en partie expliquer l'absence de prise alimentaire malgré une hyperghrélinémie.

De façon intéressante, les concentrations plasmatiques de ghreline acylée et totale sont retrouvées plus basses chez les patientes atteintes d'anorexie accompagnée d'épisodes de boulimie (AN-BP) comparées aux concentrations de ghreline retrouvées chez les patientes AN-R et malgré un IMC identique (Germain et al 2010). Ce dernier résultat suggère qu'un rôle de la ghreline dans les sensations de faim et de motivation à manger.

5.2. En situation d'excès de la balance énergétique

L'obésité résulte d'un déséquilibre chronique entre l'énergie absorbée et celle qui est dépensée. La plupart des cas d'obésité ont été associés à des concentrations diminuées de ghréline (Tschop et al 2001b) suggérant un mécanisme d'adaptation à l'excès de l'apport calorique. Ce déficit en ghréline semble majoritairement dû à la diminution de concentration plasmatique de la ghréline non acylée (Barazzoni et al 2007b, Mackelvie et al 2007, Rodriguez et al 2010) alors que la concentration en ghréline acylée est augmentée, diminuée ou inchangée en fonctions des études (Pacifico et al 2009a, Pacifico et al 2009b). Concernant l'obestatine, les données sont contradictoires, certaines études retrouvent des taux plus élevés chez les patients atteints d'obésité alors que d'autres les retrouvent abaissés (Guo et al 2007, Vicennati et al 2007, Zamrazilova et al 2008).

Parmi tous les cas d'obésité, le syndrome de Prader Willi (PWS) est le seul cas pour lequel les concentrations plasmatiques des différentes formes de ghréline sont élevées. Ce syndrome, dû à une délétion du bras court du chromosome 15, est caractérisé par une hyperphagie et une déficience en GH entre autres symptômes. Les études s'étant intéressées à ce syndrome rapportent une augmentation des taux plasmatiques de ghréline acylée en comparaison avec des sujets contrôle sains ou obèses (Cummings et al 2002, DelParigi et al 2002, Park et al 2006) alors que les concentrations en ghréline non acylée sont inchangées (Paik et al 2006, Park et al 2006).

6. Polymorphismes du gène de la préproghréline : relation avec des pathologies liées à un déséquilibre de la balance énergétique

Chez l'homme, plusieurs polymorphismes du gène de la préproghréline ont été décrits dans des pathologies humaines liées à un déséquilibre de la balance énergétique telles que l'anorexie mentale ou l'obésité. (Figure 15)

Situé dans la partie C-terminale de la ghréline mature, le polymorphisme Arg51Gln, est rare (1 à 3% au sein de la population générale) et associé à un poids plus faible au sein d'une cohorte de patients obèses (Ukkola et al 2001) et les porteurs de l'allèle Gln51 présentent une prévalence d'apparition du syndrome métabolique plus faible que les porteur de l'allèle Arg51 (Steinle 2005).

Situé entre les régions codantes pour la ghréline et l'obestatine, le polymorphisme Leu72Met est retrouvé chez 9 à 24% de la population générale suivant les études ce qui en fait le plus fréquent des polymorphismes du gène de la préproghréline. De par sa localisation, ce polymorphisme pourrait affecter la transcription de la préproghréline, sa traduction, ou sa maturation en ghréline ou en l'obestatine. Les porteurs de l'allèle Met72, présentent une plus grande prévalence de développement du syndrome métabolique (Steinle 2005), d'une obésité précoce (Korbonits et al 2002, Miraglia del Giudice et al 2004, Ukkola et al 2002) ainsi qu'une plus grande susceptibilité à développer une boulimie mentale (Ando et al 2006).

Le polymorphisme Gln90Leu est situé dans la partie codante pour l'obestatine et est relativement fréquent au sein de la population générale (entre 3 et 17%). Ce polymorphisme est aussi fréquent chez des patients atteints d'obésité que chez des sujets contrôles (Steinle 2005) cependant au sein d'une cohorte de patientes atteintes d'anorexie mentale, les jeunes femmes portant ce polymorphisme ont un indice de masse corporel le plus bas (Dardennes et al 2007).

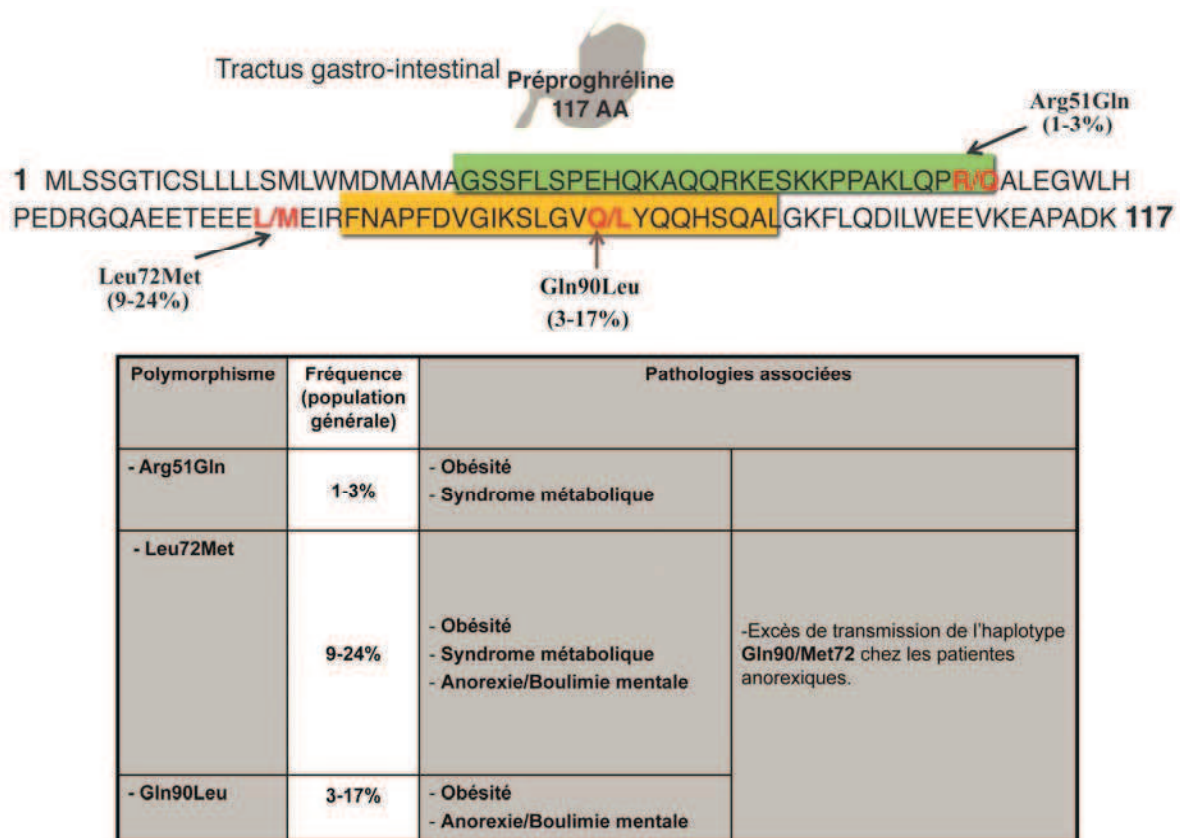


Figure 15 : Les polymorphismes du gène de la préproghréline et leur implication dans des pathologies liées à un déséquilibre de la balance énergétique.

La séquence peptidique de la ghréline est représentée en vert et la séquence de l'obestatine en orange. AA : acides aminés.

OBJECTIFS

Le rôle de la préproghréline dans la régulation de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire est complexe car elle met en jeu plusieurs peptides dérivés, dont l'obestatine qui se comporte comme un modulateur des effets de la ghréline.

Chez le rat comme la souris, l'obestatine est sécrétée dans la circulation générale en quantités équimolaires à la ghréline chez des animaux nourris *ad libitum* et ce ratio est modifié dans différentes situations physiologiques ou physiopathologiques (jeûne, anorexie, obésité). Lorsque l'obestatine est administrée en quantités équimolaires à la ghréline, celle-ci inhibe partiellement la prise alimentaire et la sécrétion de GH induites par la ghréline. Toutefois, l'origine de l'interaction entre ces deux peptides dérivés de la préproghréline reste à déterminer. Par ailleurs, des polymorphismes dans le gène de la préproghréline ont été décrits dans différents troubles nutritionnels et métaboliques chez l'Homme mais leur impact physiologique n'a jamais été exploré. Un de ces polymorphismes est localisé dans la partie du gène de la préproghréline codant pour l'obestatine humaine (Q90L) et pourrait avoir un impact sur la fonction du peptide. Le premier objectif de cette thèse a donc été :

- **De caractériser les effets d'administrations équimolaires de formes natives (Gln90) et mutées (Leu90) d'obestatine sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire induites par la ghréline et leurs sites d'interaction au niveau du système nerveux central chez la souris (Partie I).** Des administrations de ghréline et des co-administrations de ghréline et d'obestatine en quantités équimolaires afin de mimer les conditions physiologiques ont été réalisées afin d'en mesurer l'impact sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH mais surtout de déterminer si l'obestatine interagit avec la ghréline au niveau des régions clés du système nerveux central, comme les neurones à NPY et GHRH, pour le contrôle de la sécrétion de GH et/ou la prise alimentaire.

Les rôles des peptides dérivés de la préprogréline sont très divers. Pour tester leurs effets, nous disposons d'un modèle de souris KO préprogréline qui ne devraient synthétiser aucun de ces peptides dérivés. Alors que l'action stimulatrice de la gréline exogène sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire sont bien établis, le rôle de la gréline endogène, dans le contrôle de la sécrétion pulsatile de GH notamment, n'ont pas encore été décrits. Le deuxième objectif a donc été :

- **De déterminer le rôle de la préprogréline endogène sur la sécrétion pulsatile de GH et le comportement alimentaire chez la souris (Partie II).** La caractérisation et l'utilisation d'un modèle de souris ghrl/- nous a permis d'étudier le rôle de la préprogréline endogène sur la sécrétion de GH.

Plusieurs agonistes et antagonistes du GHS-R1a ont été développés ces dernières années, ce sont autant d'outils permettant de mieux comprendre le fonctionnement de la signalisation gréline acylée/GHS-R1a pour la régulation de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire. Le dernier objectif a ainsi été :

- **De mieux comprendre la régulation de la signalisation gréline acylée/GHSR-1a impliquée dans la sécrétion de GH et le comportement alimentaire (Partie III).** Notamment en comparant l'effet de différents agonistes et antagonistes synthétiques ou naturels du GHS-R1a sur la sécrétion de GH et le comportement alimentaire chez la souris sauvage et chez la souris déficiente pour la gréline (ghrl/-). Puis en étudiant l'activation neuronale induite par ces différents peptides au niveau de régions du système nerveux central impliquées dans la régulation de la sécrétion de GH et/ou du comportement alimentaire.

Partie I : Interaction au niveau du système nerveux central des peptides dérivés de la préproghréline pour le contrôle de la sécrétion de GH et de la prise alimentaire.

Situation du sujet et objectif de l'étude

Il est bien établi que la ghréline acylée exerce ses actions sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH via l'activation de son récepteur, le GHS-R 1a. Ce dernier est largement distribué au sein du système nerveux central et plus particulièrement au niveau du noyau ARC de l'hypothalamus et dans le NTS dans le tronc cérébral (Guan et al 1997 , Zigman et al 2006), deux régions impliquées dans le contrôle du comportement alimentaire et/ou de la sécrétion de GH. Au sein du noyau ARC les neurones à NPY et à GHRH expriment le GHS-R 1a (Tannenbaum et al 1998 , Willesen et al 1999) et sont des cibles de l'action de la ghréline pour le contrôle de la prise alimentaire et la sécrétion de GH (Dickson and Luckman 1997, Tannenbaum 2003 , Wang et al 2002). Cependant le site d'action de l'obestatine est inconnu ainsi que le lieu de son interaction avec la ghréline. Deux études issues du laboratoire ont montré que l'interaction entre la ghréline et l'obestatine pour réguler la sécrétion de GH ne se situait pas au niveau hypophysaire (Zizzari et al 2007) mais au niveau hypothalamique (Feng et al 2011). Pour cette étude nous avons ainsi émis l'hypothèse que les deux peptides interagissaient au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral pour réguler le comportement alimentaire.

Afin de tester notre hypothèse de travail, nous avons tout d'abord comparé différentes approches immunohistochimiques permettant de quantifier l'activation neuronale au sein de nos régions d'intérêt ainsi que différents modèles de souris transgéniques exprimant la GFP (Green-Fluorescent-Protein), protéine fluorescente servant de rapporteur, sous le contrôle du promoteur du gène NPY ou GHRH (**Chapitre de livre, Neuromethods Vol.70, Springer science**).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'interaction entre la ghréline et l'obestatine au niveau de l'ARC et du NTS en quantifiant l'activation neuronale au sein de ces deux régions. Puis afin d'identifier les sous-populations neuronales impliquées dans cette interaction, nous avons quantifié l'activation neuronale à l'aide d'approches anatomiques et électrophysiologiques au sein des neurones à NPY et GHRH grâce aux modèles de souris transgéniques exprimant la GFP étudiées précédemment (**Article 1, en révision, PLoS One**).

Enfin chez le rongeur, ce sont des ratios équimolaires de ghréline sur obestatine qui ont été retrouvés, nous avons donc co-administré ces deux peptides en quantités équimolaires afin d'être au plus près des conditions physiologiques pour étudier l'impact de

l'interaction entre ces deux peptides sur le contrôle du comportement alimentaire et la sécrétion de GH (**Article 1, en révision, PLoS One**). Nous avons de plus testé l'importance fonctionnelle d'un polymorphisme, Q90L (la glutamine en position 90 est substituée par une leucine), présent dans la séquence codante pour l'obestatine sur les effets de ce peptide. Parmi les patientes atteintes d'anorexie, celles qui portent ce polymorphisme présentent un indice de masse corporelle minimum plus bas (Dardennes et al 2007). Les expériences nécessaires pour cette dernière partie ont été réalisées suivant un protocole d'administrations croisées et randomisées des différents peptides dans lequel chaque souris est son propre contrôle.

Visualization of Activated Neurons Involved in Endocrine and Dietary Pathways Using GFP-Expressing Mice 2 3

Rim Hassouna, Odile Viltart, Lucille Tallot, Karine Bouyer, Catherine Videau, Jacques Epelbaum, Virginie Tolle*, and Emilio Badoer* 4 5

Abstract 6

Neuropeptide Y (NPY) and growth hormone releasing hormone (GHRH) neurons in the hypothalamic arcuate nucleus play an important role in the neuroendocrine control of energy homeostasis and growth hormone secretion. These neuropeptides are synthesized in such small quantities that the common practice was to use colchicine, a neuronal transport inhibitor, to enhance the levels of neuropeptides in the cell body in order to visualize them by immunocytochemistry. However, colchicine also induces a marked increase in c-Fos levels, suggesting that it affects other mechanisms than solely axonal transport. The development of transgenic mice expressing fluorescent proteins under the control of specific neuropeptide promoters allows direct visualization of specific cell population within the central nervous system. The use of these genetic tools alleviates the need for colchicine pretreatment and can thus be combined with techniques aimed at detecting activated neurons, using the protein c-Fos, as a marker.

In the present article we discuss different variants of green fluorescent protein (GFP), which vary in brightness, cellular localization and can be differentially expressed through the use of different promoters, to visualize GFP-positive neurons. We also address methods to ensure that the GFP fluorescent signal is optimized during additional immunohistochemical procedures. We compared different GFP constructs in which the fluorescence exhibits variable levels of intensity or cellular localization. Recent developments with new GFP variants expressed under the control of strong promoters may provide enhanced and increased stability of fluorescence. Two examples are mice expressing an enhanced GFP protein in GHRH neurons and the NPY-Renilla-GFP mouse, in which a long bacterial artificial chromosome sequence as a promoter and a free cytoplasmic GFP renders the signal more stable and brighter than other variations of GFPs. In these examples GFP expression is localized mostly in cell bodies, and these two models are advantageous for studies investigating the phenotypical identity of neurons activated by physiological stimuli, like ghrelin. Differential subcellular expression of GFP is highlighted by the NPY-Tau-Sapphire-GFP mice in which the blue-shifted GFP variant (Sapphire-GFP) is fused to the tau sequence, allowing its cellular targeting to axon terminals thereby making this model suitable for studies investigating neuronal terminals.

Key words: c-Fos, Green fluorescent protein, Antibody, Fluorescence, Immunohistochemistry, NPY-Tau-Sapphire-GFP, NPY-Renilla GFP 32 33

*The authors Virginie Tolle and Emilio Badoer contributed equally for this chapter.

1. Introduction

Due to its localization and the proximity of the fenestrated capillaries of the median eminence, the arcuate nucleus of the hypothalamus is a key target for peripheral signals that provide the central nervous system with information concerning the body's nutritional needs (1). The vast majority of these signals, originating either from adipocytes such as leptin or from endocrine cells along the gastrointestinal tract, such as PYY or CCK, are anorexiogenic (2). In contrast, ghrelin is the only orexigenic hormone synthesized in the gastrointestinal tract and is a long-term regulator of energy homeostasis (3). Originally ghrelin was isolated from the stomach as the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) (4, 5) and its ability to stimulate Growth hormone (GH) secretion. Several populations within the arcuate nucleus, including Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and Neuropeptide Y (NPY) neurons, express GHS-R1a receptors (6, 7) and are activated by ghrelin (8–10). NPY neurons in the hypothalamic arcuate nucleus play an important role in the neuroendocrine control of energy homeostasis. NPY neurons are also present within the dorsal vagal complex, more specifically in the nucleus tractus solitarius (NTS), a region that is also considered as a satiety center and receives information from peripheral signals, partly mediated by afferent nerves traveling through the vagal nerve bundle.

Usually, neuropeptides are synthesized as prepropeptides in small quantities and immediately targeted to the terminals and thus cannot be visualized in the cell bodies using conventional immunohistochemistry. Therefore, it was common practice to use colchicine, an inhibitor of microtubule polymerization to block neuropeptide transport and artificially enhance its expression in the soma. This requirement has been overcome by the development of transgenic mice expressing fluorescent proteins under the control of specific neuropeptide promoters that allow direct visualization of specific cell populations within the central nervous system. Several transgenic mouse models allow the identification of GHRH and NPY neuronal populations through the expression of green fluorescent protein (GFP) reporting tool. GFP-expressing mice alleviate the need for colchicine treatment and can be combined with conventional immunohistochemical techniques to identify activated neurons by detecting the protein c-Fos, a marker of increased neuronal activity (11).

In the present article the visualization of GFP-positive neurons is described. As not all GFP-expressing neurons may express sufficient GFP to be easily detected above background fluorescence,

novel developments with GFP has allowed enhanced signal intensity and increased fluorescence stability. One recent example is the development of the strong Renilla-GFP-expressing mouse under the control of the NPY promoter (12).

2. Materials

2.1. Drug

Administration to GFP-Expressing Mice

2.1.1. Animals

1. GHRH-eGFP transgenic mice (13) expressing the jellyfish *aequorea victoria* enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the transcriptional control of a rat GHRH hypothalamic promoter 83-86
2. NPY-Tau-Sapphire-GFP mice expressing the blue-shifted GFP variant fused to the protein Tau under the transcriptional control of the NPY genomic sequence (14) 87-89
3. NPY-Renilla-GFP transgenic mice expressed humanized *Renilla reniformis* green fluorescent protein (hrGFP) under control of the mouse NPY promoter fused to a long bacterial artificial chromosome (BAC) sequence driving expression of a bright and stable fluorescent signal that is more resistant to fading compared to other GFP's (12) 90-95

2.1.2. Treatments

1. Rat ghrelin was obtained in powder form from *NeoMPS Peptide* (Strasbourg, France) and stored dessicated at 4°C. When ready to use, it is recommended not to weigh out specific amounts but to reconstitute the peptide directly in the original bottle. If the peptide is reconstituted directly in saline solution, it is recommended to use the solution as soon as possible and avoid freezing/thawing cycles. If smaller quantities are to be used, the powder can be resuspended in sterile water, aliquoted according to the amount needed and can be lyophilized and stored as before. 96-105
2. Prepare a working solution of 30 nmol of ghrelin in 0.2 mL of sterile saline solution 0.9% (i.e., 99 µg in 0.2 mL). 106-107

2.1.3. Colchicine Administration

1. Anesthetic: isoflurane (*Abbot Laboratory, Centravet, Plancoet, France*) 108-109
2. Pump to deliver isoflurane (*Univentor 400 anaesthesia unit, Phymep, Paris, France*) 110-111
3. Colchicine: prepare a working solution of 50 mg in 1 mL of sterile saline solution 0.9% (*Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France*) 112-114
4. Diazepam (*Valium, Roche Laboratories, Meylan, France*) 115
5. Stereotaxic frame 116

2.2. Perfusion

1. Phosphate buffer (PB) (stock solution) 1 M (NaH_2PO_4 1 M, K_2HPO_4 1 M) further diluted to 0.2 M or 0.1 M (working solutions). This buffer is stable for several months if stored at 4°C.
2. Paraformaldehyde (PFA) 4% is prepared in PB 0.1 M (working solution) : dissolve 40 g of PAF in 500 mL of heated water at 55°C under a fumed hood and neutralize with about 1 mL of NaOH 4% and stir until solution is clear. Add 500 mL of PB 0.2 M to get the PFA in a final solution of PB 0.1 M. Filter, cool the solution, and adjust the final pH to 7.4. The PFA should be freshly prepared (the same day or the day before the experiment) and stored at 4°C until use.
3. Sodium pentobarbital (*Ceva santé animal, Libourne, France*).
4. Sucrose 30% in PB 0.1 M (working solution) should be prepared freshly and stored at 4°C.
5. 2-Methyl-butane (*Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France*) is flammable and should be kept at 4°C.
6. Saline solution.

2.3. Preparation of the Brain Slices

1. Freezing microtome (*Frigomobile, Leica, Wetzlar, Germany*).
2. Tris-buffered saline (TBS) 1 M (stock solution) : Tris base 1 M, NaCl 1.5 M, and HCl until pH is at 7.4, further diluted to 0.1 M (working solution). This buffer is stable for several months if stored at 4°C.
3. Cryoprotectant : TBS 0.1 M (working solution), glycerol 0.3 M, ethylene glycol 0.3 M. Can be stored at room temperature for several months (see Note 1).

2.4. Immunohistochemistry

1. TBS 0.1 M (working solution).
2. Triton 0.3% in TBS 0.1 M (working solution). This solution can be stored for several months at 4°C.
3. NDS = Normal donkey serum (*BioWest, Miami, FL, USA*).
4. NGS = Normal goat serum (*BioWest, Miami, FL, USA*).
5. Rabbit anti-c-Fos antibody (Ab-5, *Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA*). The stock solution can be diluted 1:2 in a final concentration of 50% glycerol and stored at -20°C.
6. Chicken anti-GFP antibody (*Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA*). The stock solution is in water and is stored directly at 4°C.
7. Rabbit anti-GHRH antiserum (L0851) raised against the 25-amino-acid C-terminal part of the mouse GHRH sequence (15).
8. Donkey anti-rabbit antibody coupled with CY3 (*Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA*). The powder stock solution can be resuspended in a final concentration of glycerol

50% to obtain a 1:2 dilution and stored at -20°C, protected from light (see Note 2).	159
9. Goat antichickens coupled with Alexa 488 (<i>Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA</i>). The stock solution is in water and can be diluted in a final concentration of glycerol 50% to obtain a 1:2 dilution and stored at -20°C, protected from light (see Note 2).	160
10. Biotinylated Rabbit Anti-c-Fos (<i>Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA</i>). The powder stock solution can be resuspended in a final concentration of glycerol 50% to obtain a 1:2 dilution and stored at -20°C.	161
11. Avidin biotin complex (ABC) (<i>Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>).	162
12. H ₂ O ₂ 30% (Stock solution) (<i>Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France</i>).	163
13. Diaminobenzidine (DAB) 10 mg pellets stored at -20°C (<i>Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France</i>).	164
14. Gelatin coated slides or superfrost.	165
15. Coverslip.	166
16. Staining sets (6×4 wells) containing a 1/8" leakproof laminated bottom, 1/8" lid and a 5/8" insert with 6×4 array 500 µm mesh (<i>Nason Machine, Fort Bragg, CA, USA</i>).	167
17. Small paintbrush (N°4).	168
18. Fluoromount (<i>SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA</i>) (See Note 3).	169
19. Permount (<i>Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France</i>).	170
20. Vectashield (<i>Vector Laboratories, Burlingame, CA</i>) stored in the dark and at 4°C (See Note 3).	171
21. Zeiss Axioplan microscope (<i>Carl Zeiss, Le Pecq, France</i>) and Leica SP2 or SP5 confocal microscope (<i>Leica, Wetzlar, Germany</i>).	172

3. Methods 190

3.1. Drug Administration to GFP-Expressing Mice	
3.1.1. Animals	191
3.1.2. Treatments	192
1. Animals were housed on a 12/12 h light/dark cycle at 22°C with <i>ad libitum</i> access to regular chow and water	193
2. Intraperitoneal injections (ip) were performed between 8.00 and 11.00am (see Note 4)	194
1. Each animal receives intraperitoneal injections of either:	195
– Ghrelin (0.2 mL of working solution)	196
– Saline (0.2 mL)	197

- 198 2. After injection, return the animals into their home cage
 - 199 3. Ninety minutes after treatment, perfuse the animal
-
- 200 **3.1.3. Colchicine** 1. Pretreat mice with diazepam (100 µg/30 g BW, ip) to avoid
 - 201 **Administration** convulsion induced by colchicine
 - 202 2. Deeply anesthetize the mouse with isoflurane (200 mL/min,
 - 203 2% isoflurane)
 - 204 3. Place the mouse on the stereotaxic frame
 - 205 4. Insert a micropipette filled with the colchicine solution into
 - 206 the lateral ventricle (See Note 5)
 - 207 5. Slowly inject 1 µL of the colchicine solution delivered with a
 - 208 microinjecting pump (0.007 µL/min)
 - 209 6. Leave the micropipette in place for an additional 10-min period
 - 210 in order to reduce backflow
 - 211 7. Forty-eight hours after recovery, perfuse the animal
-
- 212 **3.2. Perfusion** 1. Anesthetize the animals by intraperitoneal injection of sodium
 - 213 pentobarbital (~1.25 mg per 25 g of body weight) (see Note 6).
 - 214 2. Check by tail pinching that the mouse is fully asleep and per-
 - 215 fuse the animals through the aorta with saline solution (1 min)
 - 216 followed by 4% PFA in PB 0.1 M kept in ice, for 9 min at
 - 217 20 mL/min under a fumed hood.
 - 218 3. Dissect the brains and postfix in 4% PFA in PB 0.1 M for 2 h
 - 219 at room temperature.
 - 220 4. Leave the brains for a minimum of 2 days in a 30% sucrose
 - 221 solution, at 4°C.
 - 222 5. Freeze the brains by immersing them in 2-methyl-butane at
 - 223 -30 to -35°C (see Note 7) and store them at -80°C until fur-
 - 224 ther usage.
-
- 225 **3.3. Preparation** 1. Cut 25 µm coronal brain sections using a freezing microtome
 - 226 **of the Brain Slices** (see Note 8).
 - 227 2. Slices can be kept in the cryoprotectant solution at -20°C or
 - 228 collected in TBS and immediately processed for immunochem-
 - 229 istry (see Note 1).
-
- 230 **3.4. Immuno-** 1. Immunohistochemistry is performed on free-floating sections
 - 231 **histochemistry** (see Note 8). Sections should be protected from light since
 - 232 they contain GFP.
 - 233 **3.4.1. Immuno-** 2. Select the sections to be stained and transfer them into the
 - 234 **histochemistry with** staining sets with a small paintbrush (see Note 9).
 - 235 **Fluorescence** 3. Wash the sections overnight in TBS 0.1 M under agitation, at
 - 236 room temperature (see Note 1).
 - 237 4. The following day, rinse the slices four times, 10 min each
 - 238 time, in TBS 0.1 M under agitation, at room temperature.

5. Incubate for 1 h in the blocking solution (TBS 0.1 M, Triton 0.3%, NDS 5% and/or NGS 5%) under agitation, at room temperature (see Note 10).	239 240 241
6. Incubate overnight with the primary antibody solution (TBS 0.1 M, Triton 0.3%, NDS 0.5% and/or NGS 0.5%, anti-c-Fos 1/20,000 and/or anti-GFP 1/2,000 or anti-GHRH 1/3,000) under agitation, at room temperature (see Note 10).	242 243 244 245
7. The following day, rinse the slices four times, 10 min each time, in a solution of 0.1 M TBS, under agitation, at room temperature.	246 247
8. Incubate for 1 h with the secondary antibody solution (TBS 0.1 M, NDS 0.5%, NGS 0.5%, donkey antirabbit Cy3 at 1/800, and goat antichickens Alexa 488 at 1/400) under agitation, at room temperature (see Notes 10–12).	248 249 250 251
9. Then, rinse four times for 10 min under agitation, at room temperature.	252 253
10. Counterstain the sections using DAPI or SYTOX nuclear markers in order to visualize the anatomical landmarks of the brain (see Note 13).	254 255 256
11. Mount the sections on superfrost or gelatin-coated slides. Air-dry and coverslip sections using Fluoromount or Vectashield. Store at 4°C in the dark (see Note 2).	257 258 259

3.4.2. Immuno-histochemistry with Diaminobenzidine

1. Immunohistochemistry is performed on free-floating sections as described above (see Note 8).	260 261
2. Select the sections and transfer them into the staining sets with a small paintbrush (see Note 9).	262 263
3. Wash the sections overnight in TBS 0.1 M under constant agitation, at room temperature (see Note 1).	264 265
4. The following day, rinse the sections four times, 10 min each time, in TBS 0.1 M under agitation, at room temperature.	266 267
5. Incubate the sections for 30 min in H ₂ O ₂ 0.3% in TBS 0.1 M under agitation, at room temperature to inactivate endogenous peroxidase (should be prepared freshly).	268 269 270
6. Wash the sections four times, 10 min each time, in a solution of 0.1 M TBS, under agitation, at room temperature.	271 272
7. Incubate for 1 h in the blocking solution (TBS 0.1 M, Triton 0.3%, NDS 5%) under agitation, at room temperature (see Note 10).	273 274 275
8. Incubate overnight with the primary antibody solution (TBS 0.1 M, Triton 0.3%, NDS 0.5% and/or NGS 0.5%, anti c-Fos 1/20,000) under agitation, at room temperature (see Note 10).	276 277 278
9. The following day, rinse the sections four times, 10 min each time, in a solution of 0.1 M TBS, under agitation, at room temperature.	279 280 281

10. Incubate for 2 h with the secondary antibody solution (TBS 0.1 M, NDS 0.5%, biotinylated donkey antirabbit at 1/500) under agitation, at room temperature (see Notes 10 and 11).
11. Then, rinse four times for 10 min under agitation, at room temperature.
12. Incubate the slices with the ABC under agitation, at room temperature: mix two drops of A and two drops of B in 5 mL of TBS 0.1 M (should be prepared 30 min ahead).
13. Wash the slices four times, 10 min each time, in a solution of 0.1 M TBS, under agitation, at room temperature.
14. During the washing step, prepare DAB 0.05% by dissolving a 10 mg pellet in 20 mL of TBS 0.1 M under a fumed hood and with gloves, filter this solution and add 33 μ L of H₂O₂ 30%. Discard all plastics in special trashes.
15. Incubate the sections with the DAB solution until a brown precipitate appears (about 2 min but may be variable) and wash with TBS 0.1 M to stop the reaction.
16. Mount the slices on superfrost or gelatin coated slides and air-dry the sections.
17. Dehydrate in successive alcohol baths (10 min in 70% ethanol, 10 min in 95% ethanol, 10 min in 100% ethanol) and 10 min in Xylene before mounting in Permount medium with coverslip.

3.5. Analysis/ Interpretation of Data

3.5.1. Visualization and Quantification of Cells/ Nuclei by Epifluorescence Using Optical Microscopy

1. The anti-GFP and the endogenous Renilla-GFP signals can be observed with a normal GFP filter set (excitation: 475/40 nm and emission: 530/50 nm) and the CY3 signal can be observed with a CY3 filter set (excitation: 545/25 nm and emission: 605/70 nm). The endogenous Sapphire-GFP can be observed with a special sapphire filter set (excitation: 395/40 nm and emission: 510/40 nm).
2. The section is initially observed with a small magnification ($\times 5$ or $\times 10$) in order to observe the whole structure and determine in which nuclei the staining is localized. To count numbers of cells or nuclei stained, choose the $\times 40$ magnification (see Note 14).
3. The Metaview software (or similar) is used to take pictures on the epifluorescent Axioplan microscope.
4. Mercator software (or similar) is used to outline the region of interest and count the nuclei using a pointing tool.

3.5.2. Colocalization Detection Using Confocal Microscopy

1. Three different lasers are used: an Argon/Krypton 488 nm ion laser in order to observe the green fluorescence, a He/Ne 543 nm laser in order to observe the red fluorescence, and a diode 405 nm laser to observe the sapphire fluorescence. The range of emission used to detect the Alexa488/endogenous GFP signal, the CY3 signal, and the sapphire signal are respectively 498–522, 568–674, and 490–530 nm.

	2. Immunostained sections through the arcuate nucleus of the hypothalamus and the dorsal vagal complex of the brainstem are analyzed using a $\times 40$ objective (numerical aperture 1.25). Adjacent image planes through the z -axis are collected over a $10\ \mu\text{m}$ thickness (where staining is the strongest) using a $1\ \mu\text{m}$ z -step and scanned three times at a frequency of 200 Hz. A Pinhole size of 1 Airy unit is used for each channel. In case of multiple labelings, acquisitions are performed using a sequential set-up to maximize spectral separation.	326 327 328 329 330 331 332 333 334
	3. All images are saved and stored for further analysis.	335
3.5.3. Analysis of Confocal Data	1. For each staining (Alexa 488/GFP and CY3), the ten images collected from each section using the confocal microscope are stacked in a single file and the two stacks are merged.	336 337 338
	2. The Image J. software (or similar) is then used to count the colocalized cells using a pointing tool in each section of the Z-stack to ensure that the same cell is not counted twice in adjacent Z planes.	339 340 341 342
3.6. Application of the Technique/Interpretation of Data	Many neuropeptides are synthesized in such small quantities that they cannot be visualized in the cell body using conventional immunohistochemistry. As alluded in the introduction, before the development of transgenic mice expressing fluorescent proteins under the control of specific neuropeptide promoters, colchicine, a blocker of axonal transport, was commonly used to enhance the levels of neuropeptides in the cell body. For example, GHRH neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus could not be visualized in cell bodies without colchicine pretreatment (data not shown). Initially shown to block axonal transport of noradrenaline (16), colchicine also induces a marked increase in c-Fos levels, suggesting that it affects other mechanisms than solely axonal transport (17). Most importantly, colchicine is toxic to the animal, which rules out its use in studies aimed at measuring neuronal activity using early gene markers. In mice expressing the eGFP under the control of the GHRH promoter, GHRH neurons can easily be visualized without any pretreatment. The localization of the endogenous eGFP signal in neurons coincides with that of endogenous GHRH visualized using an anti-GHRH antibody in animals that were treated with colchicine (Fig. 1).	343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362
3.6.1. Visualization of Neuropeptides Using GFP-Expressing Mice Alleviates the Need for Colchicine		
3.6.2. Visualization of Activated Neurons: Comparison of Chromogenic Versus Fluorescence-Based Immunodetection	c-Fos protein can be detected using immunofluorescence or using DAB as a chromogen. Immunofluorescence is good for confocal use and unequivocal colocalization studies but the signal can bleach with time, whereas DAB is good for permanent staining. As shown in Fig. 2, the detection of DAB may be slightly more sensitive than fluorescence as the number of c-Fos positive nuclei in serial sections of the same animal is slightly higher with DAB than with fluorescence. However, using DAB as the chromogen is more time-consuming	363 364 365 366 367 368 369 370

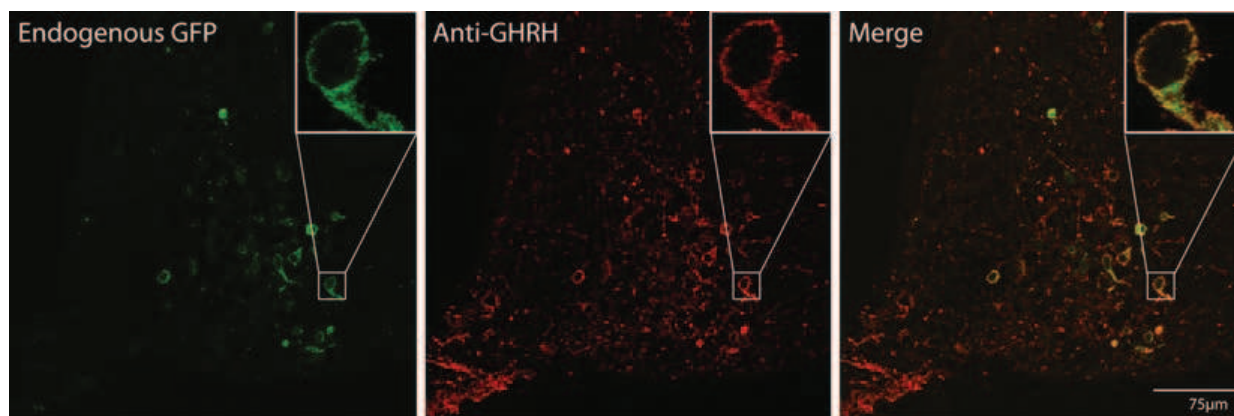


Fig. 1. Visualization of endogenous GFP fluorescence (*left panel*), growth hormone releasing hormone (GHRH) positive neurons detected using an anti-GHRH antibody (*middle panel*) and following the merger of both signals (*right panel*) in 30 μm-thick coronal sections of arcuate nucleus in a GHRH-eGFP mouse injected with colchicine.

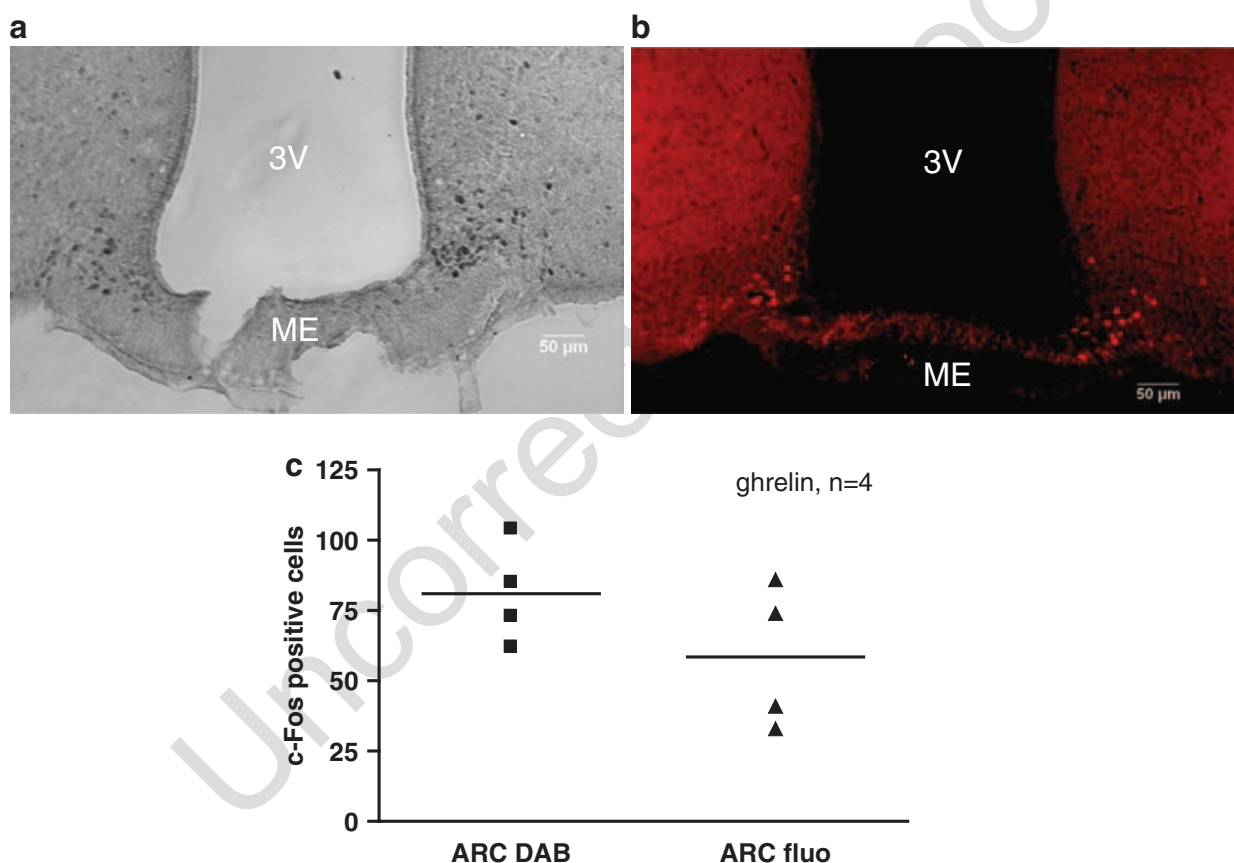


Fig. 2. Visualization of c-Fos positive cells using a chromogenic visualization method (*a*) or fluorescence immunohistochemistry (*b*) and quantification of c-Fos positive nuclei in serial sections of the arcuate nucleus (ARC) (*c*) from mice injected with 30 nmol ghrelin intraperitoneally. *ME* median eminence; *3V* third ventricle.

371 and colocalization studies using DAB may provide more equivocal
372 evidence of colocalization than immunofluorescence.

373 3.6.3. Weak GFP Signal
374 Can Be Improved by the
375 Utilization of an Anti-GFP
376 Antibody

Under perfused conditions, not all GFP-expressing neurons may express sufficient GFP to be easily detected above background fluorescence. In such instances, it is possible to “enhance” the detection of GFP by using an antibody against GFP and to visualize

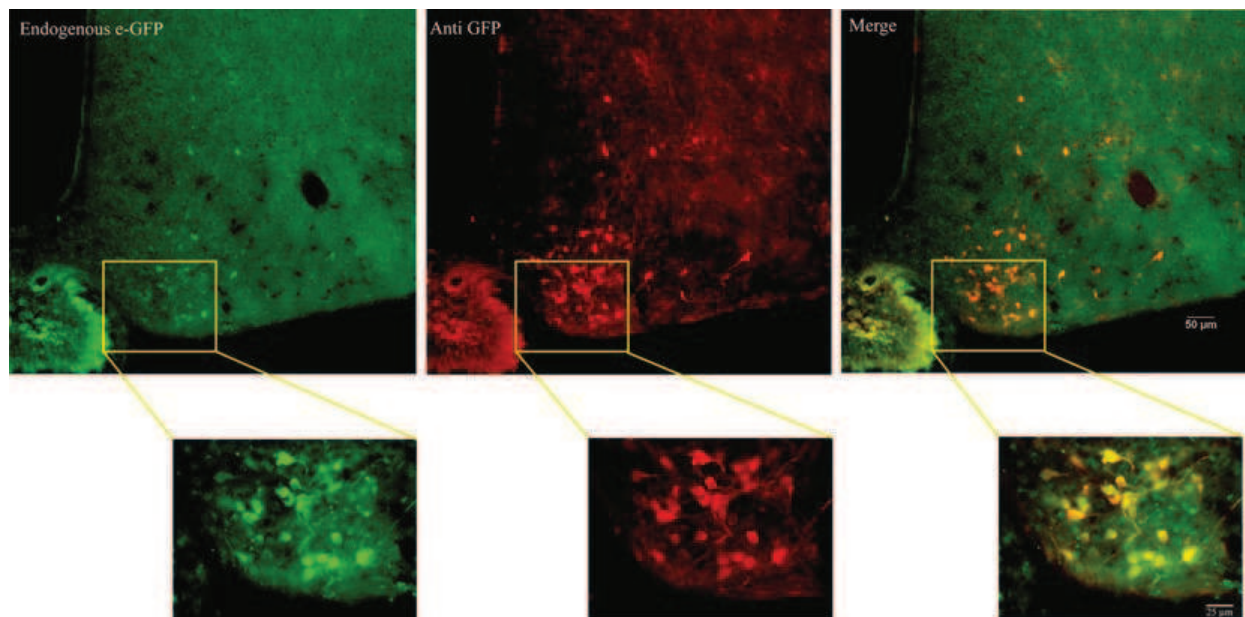


Fig. 3. Visualization of endogenous GFP (*left panel*), anti-GFP signal using an anti-GFP antibody (*middle panel*) and the merger of both signals (*right panel*) in 25 µm-thick coronal sections of the ARC in a GHRH-eGFP mouse. Insets in the *top panels* are shown at higher magnification in the *lower panels*.

it using standard immunofluorescence histochemistry (Figs. 3 and 4). Antibodies can be raised against a common epitope found in different GFP isoforms and, therefore, will recognize eGFP or Sapphire-GFP. As illustrated in Fig. 3, eGFP in GHRH-eGFP mice has a strong signal but the signal to noise ratio is improved when using an anti-GFP antibody (Fig. 3).

A further example is the NPY-Tau-Sapphire-GFP mouse in which the GFP is blue-shifted and can be visualized with a confocal microscope using a 405 laser. As the signal from the Sapphire-GFP was weak and bleached quickly in the arcuate nucleus of the hypothalamus, an anti-GFP antibody was used to improve the signal (Fig. 4). Using the anti-GFP antibody, more GFP-positive cells were visible than with the endogenous GFP fluorescence. However, in the brainstem, the endogenous Sapphire-GFP signal was much stronger and could be visualized under an epifluorescence microscope equipped with a classical GFP filter set without the need for signal amplification.

3.6.4. Visualization of Activated Neurons (*c-Fos*) in NPY-Tau-Sapphire-GFP or NPY-Renilla-GFP Mice

As mentioned previously, colchicine is toxic and this prevents studies aimed at detecting the neuropeptide content in cell bodies in combination with functional or physiological experimentation. GFP-expressing mice alleviate the need for colchicine treatment and can be combined with techniques aimed at detecting activated neurons, using the protein, *c-Fos*, as a marker.

As not all GFP-expressing neurons may express sufficient GFP to be easily detected above background fluorescence, new developments with modified GFP may provide enhanced and increased stability of fluorescence. One example is the development of the Renilla-GFP-expressing mouse under the control of the NPY promoter. In this mouse, the use of a long BAC sequence (clone

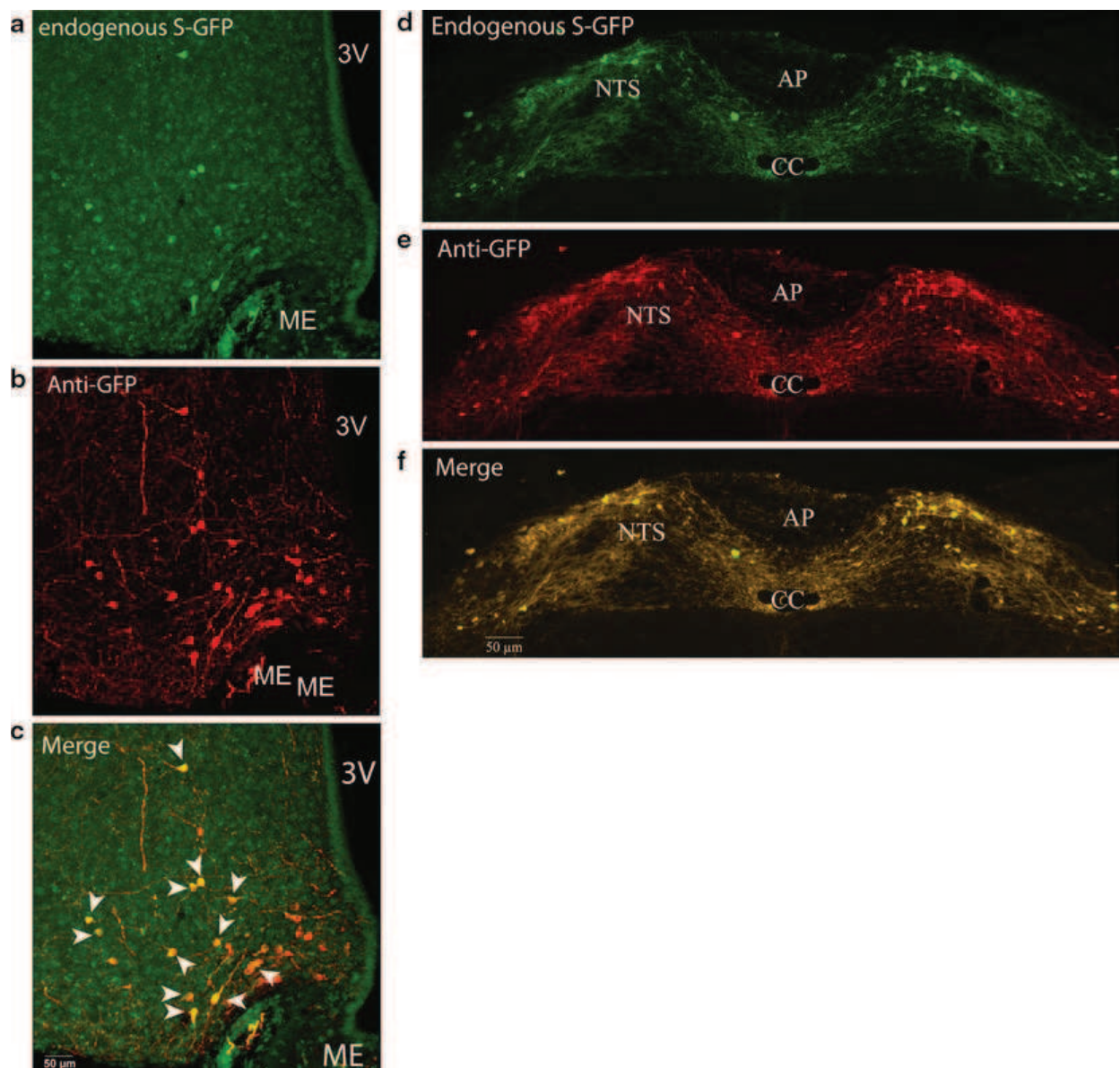


Fig. 4. Visualization of endogenous GFP and anti-GFP signal using an anti-GFP antibody in 25 µm-thick coronal sections of the ARC (*left panel*, confocal microscope) and dorsal-vagal complex (*right panel*, epifluorescence microscope) in a NPY-Tau-Sapphire-GFP mouse. (a) Endogenous Sapphire-GFP, (b) anti-GFP, (c) Merge of both signals. ME median eminence; 3V third ventricle; AP area postrema; NTS nucleus tractus solitarius; cc central canal.

[AU1]

name=RP24-177I12) (12) fused to the mouse NPY promoter sequence and combined to a free cytoplasmic GFP renders the signal more stable and brighter than other variants of GFPs and localized mostly in cell bodies. In contrast to the Sapphire-GFP signal, which is addressed mostly in terminals in noncolchicine-treated animals (12, 14) and, thus, is suitable for studies investigating axon terminals (18), the Renilla-GFP-expressing mouse is an appropriate model for studies investigating neuropeptide content of neurons activated by physiological stimuli. For instance, after intraperitoneal administration of ghrelin, we observed c-Fos expression in only 8% of GFP-positive neurons using NPY-Tau-Sapphire-GFP mice, whereas c-Fos was activated in 27% of arcuate GFP-positive neurons using Renilla-GFP mice (Figs. 5 and 6).

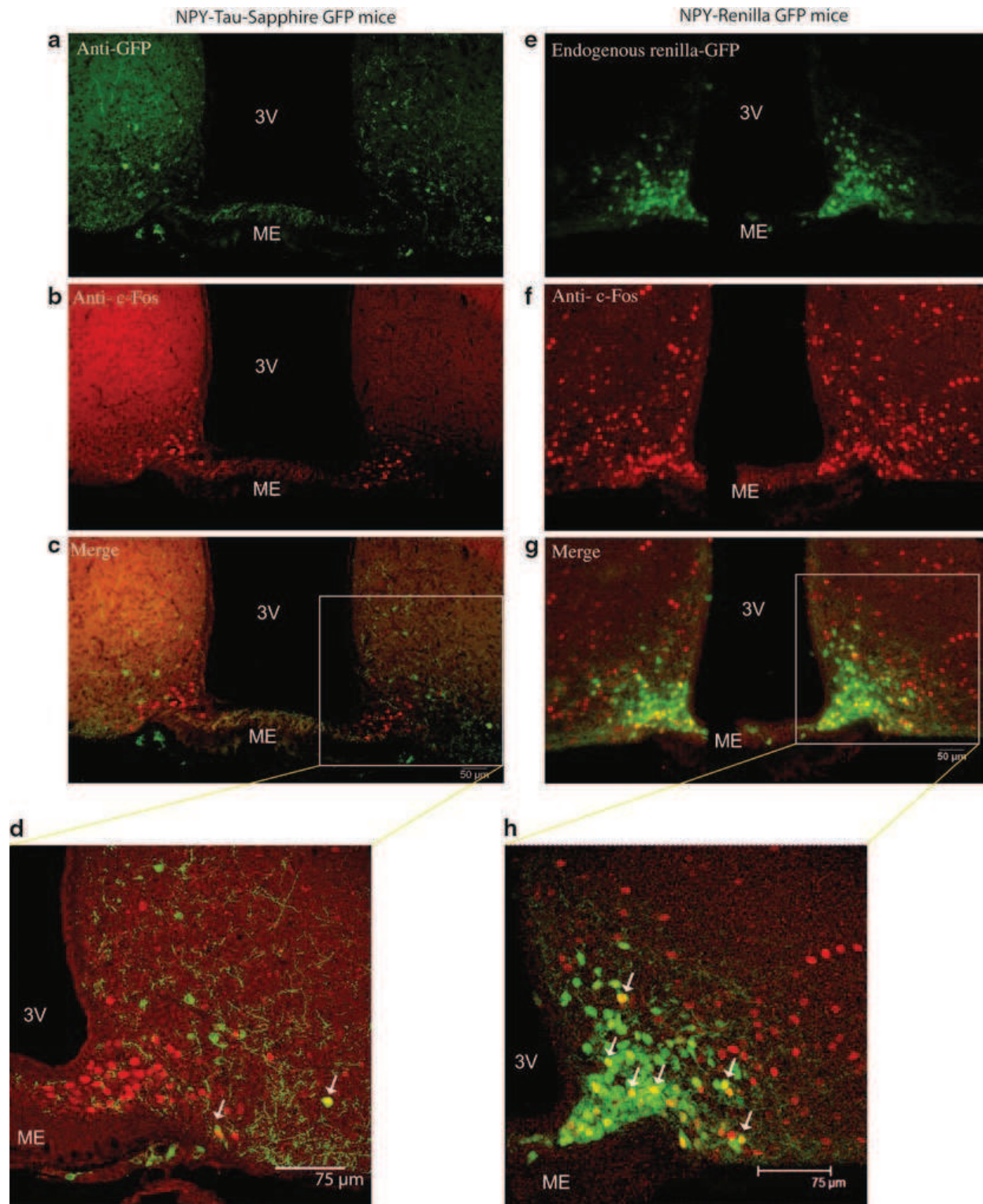


Fig. 5. Visualization of GFP and c-Fos in 25 μm-thick coronal sections of the ARC in a NPY-Tau-Sapphire-GFP mouse and in a NPY-Renilla-GFP mouse following intraperitoneal injections of ghrelin. *Left panel* shows a NPY-Tau-Sapphire-GFP mouse: **(a)** GFP signal using an anti-GFP antibody, **(b)** c-Fos staining using an anti-c-Fos antibody, **(c)** merge of both signals, **(d)** higher confocal magnification of **(c)**. *Right panel* shows a NPY-Renilla-GFP mouse: **(a)** Endogenous GFP signal, **(b)** c-Fos staining using an anti-c-Fos antibody, **(c)** merge of both signals, **(d)** higher confocal magnification of **(c)**. *White arrows* indicate cells expressing both GFP and c-Fos.

[AU2]

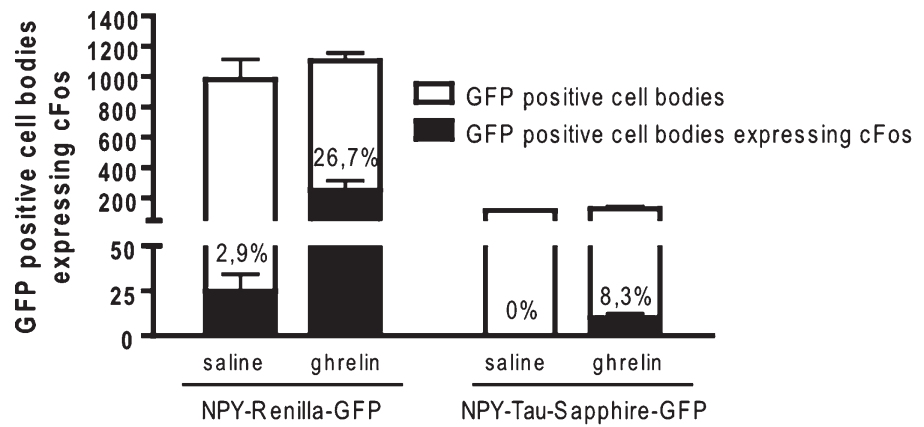


Fig. 6. Total number of GFP-positive cell bodies expressing c-Fos in the ARC (2.2–1.6 mm from interaural line) after intraperitoneal injections of saline vs. ghrelin in NPY-Tau-Sapphire-GFP mice (saline: $n=5$, ghrelin: $n=5$) and in NPY-Renilla-GFP mice (saline: $n=3$, ghrelin: $n=2$). Percentages represent the proportion of GFP-positive cells expressing c-Fos. GFP-positive cell bodies expressing c-Fos: $P<0.05$ ghrelin vs. saline (in both transgenic mice) and $P<0.05$ NPY-Renilla-GFP mice treated with ghrelin vs. NPY-Tau-Sapphire-GFP mice treated with ghrelin. GFP-positive cell bodies: $P<0.05$ NPY-Renilla-GFP vs. NPY-Tau-Sapphire-GFP mice.

[AU3]

4. Notes

1. Cryoprotectant is used to store slices at -20°C to preserve their antigenicity for several months. It is important to carefully wash the sections (at least 1 h) in order to remove all cryoprotectant before performing the immunohistochemistry. For shorter periods of conservation (1 month), sections can also be stored at 4°C in TBS 0.1 M containing sodium azide (50 mg/100 mL). Sodium azide, used to prevent bacterial contamination, is toxic and should be prepared with gloves. Slices should also be washed before immunohistochemistry. Although tissues are stored at 4°C , antigenicity may still deteriorate over time and it is better to perform immunohistochemistry as soon as possible.
2. The secondary antibodies coupled to CY3 or Alexa 488 as well as the slices incubated with these antibodies should be protected from light to avoid bleaching. Once the sections are mounted on slides, they should also be stored in the dark and preferably at 4°C to preserve fluorescence.
3. Fluoromount and Vectashield are mounting mediums containing antibleaching agents that help maintain the fluorescence. Fluoromount is a semihardest mounting medium that polymerizes and cannot easily be removed, whereas coverslips mounted with Vectashield can be removed.
4. As c-Fos protein is a transcription factor that can be activated by a variety of stimuli, including stress, it is recommended to

- manipulate and habituate the animals to intraperitoneal injections several days before the experiments (19, 20).
5. Stereotaxic coordinates for the lateral ventricle were chosen according to the atlas of Franklin and Paxinos (21): 0.07 mm posterior, 0.10 mm lateral, and 0.21 mm deep from bregma.
6. c-Fos is an immediate early gene that is induced very rapidly but transiently (19, 20). The protein c-Fos reaches maximum levels approximately 60–120 min after stimulation. Ghrelin has been shown to increase c-Fos production in several brain nuclei, including the arcuate nucleus, after intraperitoneal injection (8, 9, 22).
7. For freezing a mouse brain in 2-methyl-butane, temperature should not go below -35°C because the brain tissue may be damaged.
8. Twenty-five micro meter-thick brain sections should be handled with care because of their fragility. This thickness is more adequate for colocalization studies when using epifluorescent microscope. However, if using a confocal microscope, thicker sections (over 30 μm) are also adequate. Using free-floating sections allows the antibody to penetrate into the tissue on both sides. On thicker sections, the antibody will not stain the whole tissue and it should be taken into consideration when analyzing the staining.
9. Staining sets consist of an array of 6×4 wells with a 500 μm mesh at the bottom. Sections can be placed in these wells and the array can easily be transferred into a leakproof laminated container. This system is very convenient to wash all the sections without too much handling of the brain slices. However, the container's volume in which the meshed wells fit is big and consumes a lot of reagents. In order to save antibodies, the tissue sections can be transferred into individual 48 well-plates for the incubation steps.
10. The serum for the blocking solution will be chosen depending on the nature of the secondary antibody (e.g., NDS with a secondary antibody produced in donkey or NGS with a secondary antibody produced in goat). If two primary antibodies are used in the same incubation (e.g., Rabbit Anti-c-Fos and Chicken Anti-GFP), two secondary antibodies directed against the species of the first antibodies should be used (e.g., Donkey AntiRabbit and Goat AntiChicken, respectively). However, it is recommended to use secondary antibodies raised in the same specie to minimize background (e.g., Goat antirabbit and Goat antichick). In this case, a single blocking solution (e.g., NGS) should be used.
11. Dilutions of primary and secondary antibodies should be optimized. The best signal to noise ratio in our conditions was

obtained by testing serial dilutions of the rabbit anti-c-Fos (1:5,000–1:20,000) and chicken anti-GFP (1:1,000–1:20,000). Dilutions should be done extemporaneously.

12. Fluorochrome that emits light into the green (e.g., Alexa 488) and orange/red (e.g., CY3) are classical tools used for colocalization studies, as their emission spectra are easily distinguishable. For more details on fluorochromes, visit the Abcam website: <http://www.abcam.com/fluorochromes>.
13. DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and SYTOX are fluorescent nuclear markers that are used to visualize brain structures and define anatomical landmarks. DAPI can penetrate both alive and dead cells. DAPI is excited by UV light and emits at 449 nm. SYTOX is a high-affinity nucleic acid stain that easily penetrates dead cells. Different SYTOX dyes exist (e.g., SYTOX green that emits at 523 nm) (Invitrogen). As these markers incorporate into the DNA, they should be manipulated with caution (gloves). Concentrations of these dyes should be tested empirically.
14. When observing a section at a high magnification ($\times 40$), the signal can fade. Consequently, this magnification should be used for short period of time and/or only when performing the quantification or acquiring images.

Acknowledgments

We are grateful to Dr ICAF Robinson (National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, England) for providing the GHRH-GFP mice, to Dr Anne Lorsignol (UMR 5241 CNRS-UPS, Toulouse, France) for the NPY-Sapphire-GFP mice and to Dr Odile Viltart (INSERM U837, Lille, France) for the NPY-Renilla-GFP mice.

References

1. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295
2. Goldstone AP (2006) The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Prog Brain Res* 153:57–73
3. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908–913
4. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–660
5. Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A, Alexander G, Chenard MP, Rio MC (2000) Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 119:395–405
6. Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD (1998) Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 139:4420–4423
7. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J (1999) Co-localization of growth hormone

- 547 secretagogue receptor and NPY mRNA in the
548 arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*
549 70:306–316
- 550 8. Kobelt P, Wisser A, Stengel A, Goebel M,
551 Inhoff T, Noetzel S, Veh R, Bannert N,
552 Vandervoort I, Wiedenmann B (2008)
553 Peripheral injection of ghrelin induces Fos
554 expression in the dorsomedial hypothalamic
555 nucleus in rats. *Brain Res* 1204:77–86
- 556 9. Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y (2002)
557 Peripheral ghrelin selectively increases Fos
558 expression in neuropeptide Y—synthesizing
559 neurons in mouse hypothalamic arcuate
560 nucleus. *Neurosci Lett* 325:47–51
- 561 10. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM-H,
562 Luckman SM (2002) Acute central ghrelin and
563 GH secretagogues induce feeding and activate
564 brain appetite centers. *Endocrinology*
565 143:155–162
- 566 11. Cham JL, Badoer E (2007) Exposure to a hot
567 environment can activate spinally projecting
568 and nitroergic neurones in the lower brainstem
569 in the rat. *Exp Physiol* 92:529–540
- 570 12. van den Pol AN, Yao Y, Fu L-Y, Foo K, Huang
571 H, Coppari R, Lowell BB, Broberger C (2009)
572 Neuromedin B and gastrin-releasing peptide
573 excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons
574 in a novel transgenic mouse expressing strong
575 Renilla green fluorescent protein in NPY neu-
576 rons. *J Neurosci* 29:4622–4639
- 577 13. Balthasar N, Mery P-F, Magoulas CB, Mathers
578 KE, Martin A, Mollard P, Robinson ICAF
579 (2003) Growth hormone-releasing hormone
580 (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green
581 fluorescent protein transgenic mice: a ventral
582 hypothalamic network. *Endocrinology*
583 144:2728–2740
- 584 14. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S,
585 Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath
586 TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus
feeding circuits by leptin. *Science* 587
304:110–115 588
- 589 15. Bouyer K, Loudes C, Robinson ICAF,
590 Epelbaum J, Faivre-Bauman A (2006) Sexually
591 dimorphic distribution of sst2A somatostatin
592 receptors on growth hormone-releasing hor-
593 mone neurons in mice. *Endocrinology*
147:2670–2674 594
- 595 16. Dahlström A (1968) Effect of colchicine on
596 transport of amine storage granules in sympa-
597 thetic nerves of rat. *Eur J Pharmacol*
5:111–113 598
- 599 17. Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hökfelt T
600 (1989) Expression of c-Fos immunoreactivity
601 in transmitter-characterized neurons after stress.
602 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9569–9573
- 603 18. Rancillac A, Lainé J, Perrenoud Q, Geoffroy
604 H, Ferezou I, Vitalis T, Rossier J (2010)
605 Degenerative abnormalities in transgenic neo-
606 cortical neuropeptide Y interneurons express-
607 ing tau-green fluorescent protein. *J Neurosci*
Res 88:487–499 608
- 609 19. McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou
610 V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a
611 molecular switch for long-term adaptation
612 in the brain. *Brain Res Mol Brain Res*
132:146–154 613
- 614 20. Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988)
615 Expression of c-fos protein in brain: metabolic
616 mapping at the cellular level. *Science*
240:1328–1331 617
- 618 21. Franklin BJ, Paxinos G (1997) The mouse
619 brain in stereotaxic coordinates. Academic, San
620 Diego
- 621 22. Rüter J, Kobelt P, Tebbe JJ, Avsar Y, Veh R,
622 Wang L, Klapp BF, Wiedenmann B, Taché Y,
623 Mönnikes H (2003) Intraperitoneal injection
624 of ghrelin induces Fos expression in the para-
625 ventricular nucleus of the hypothalamus in rats.
626 *Brain Res* 991:26–33

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Dans les modèles de souris NPY-renilla-GFP et GHRH-e-GFP, l'expression de la GFP, et par conséquent de la fluorescence, est localisée principalement au niveau des corps cellulaires, même en absence de colchicine, permettant de quantifier le nombre de neurones GFP positifs et ainsi de réaliser des études de colocalisation entre un marqueur neuronal et les neurones à NPY ou GHRH. Cette mesure a été faite au niveau du noyau ARC le long de l'axe rostro-caudal (Figure 16) et nous a permis de déterminer les niveaux de coupe qui présentent le maximum de neurones à NPY et GHRH pour les études de co-localisation avec le c-Fos.

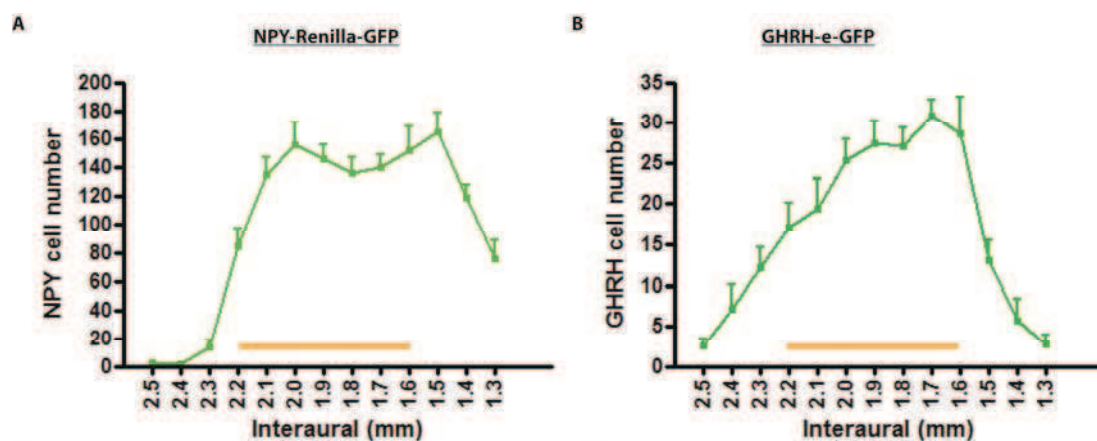


Figure 16 : Quantification du nombre de neurones à NPY, n=11 (A) et GHRH, n=18 (B) le long de l'axe rostro-caudal du noyau ARC de l'hypothalamus.

La barre orange représente les niveaux auxquels est présente l'éminence médiane. Les données sont représentées en valeurs moyennes \pm SEM.

C'est au niveau de l'éminence médiane que les neurones à NPY et GHRH sont les plus nombreux dans l'ARC. Il est à noter que le nombre de neurones à NPY est nettement plus important que celui des neurones à GHRH. Pour l'étude suivante, les co-localisations avec le marquage c-Fos ont donc été réalisées entre les interaurales 2,2 et 1,6mm tant pour les neurones à NPY que GHRH.

RESULTATS NOTABLES

Les résultats des quantifications de l'activation neuronale obtenus après immunohistochimie à la DAB ou en fluorescence apparaissent équivalents. Les études de co-localisation sont cependant plus aisées avec la fluorescence, c'est la technique qui sera adoptée pour les études suivantes.

Les souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle des promoteurs NPY ou GHRH sont des outils pratiques pour l'étude de ces sous populations neuronales. Néanmoins, tous les modèles de souris GFP ne sont pas équivalents. Chez les souris exprimant la GFP fusionnée à la protéine Tau par exemple, la GFP est majoritairement exprimée au niveau des terminaisons nerveuses rendant faciles les études concernant les terminaisons et projections nerveuses mais plus difficiles les études de co-localisations cellulaires. Chez les souris exprimant la GFP sous le contrôle de promoteurs puissants comme les souris NPY-Renilla-GFP et GHRH-e-GFP, la fluorescence est plus forte et plus stable. Ce sont ces modèles qui seront utilisés par la suite pour nos études de co-localisation. Enfin, nous avons également pu identifier grâce à ces modèles les niveaux les plus adéquats pour nos études de co-localisation avec le marqueur d'activation neuronale, c-Fos, en quantifiant le nombre de neurones à NPY et GHRH le long de l'axe rostro-caudal.

Ces travaux préliminaires nous ont ainsi permis de choisir le modèle adéquat pour l'étude de l'interaction éventuelle entre la ghréline et l'obestatine au sein des neurones à NPY et GHRH.

A Natural Variant of Obestatin, Q90L, Inhibits Ghrelin's Action on Food Intake and GH Secretion and Targets NPY and GHRH Neurons in Mice

Rim Hassouna¹, Philippe Zizzari¹, Odile Viltart², Seung-Kwon Yang³, Robert Gardette¹, Catherine Videau¹, Emilio Badoer⁴, Jacques Epelbaum¹, Virginie Tolle^{1*}

1 UMR-S 894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **2** UMR 837 INSERM, Laboratoire "Développement et Plasticité du Cerveau Postnatal", Centre de Recherches JPARC, Lille and Université Lille Nord de France (USTL- Lille 1), Lille, France, **3** School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, Skerman Building (65), St Lucia, Queensland, Australia, **4** School of Medical Sciences and Health Innovations Research Institute, RMIT University, Bundoora, Melbourne, Victoria, Australia

Abstract

Background: Ghrelin and obestatin are two gut-derived peptides originating from the same ghrelin/obestatin prepropeptide gene (*GHRL*). While ghrelin stimulates growth hormone (GH) secretion and food intake and inhibits γ -aminobutyric-acid synaptic transmission onto GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) neurons, obestatin blocks these effects. In Humans, *GHRL* gene polymorphisms have been associated with pathologies linked to an unbalanced energy homeostasis. We hypothesized that one polymorphism located in the obestatin sequence (Q to L substitution in position 90 of the ghrelin/obestatin prepropeptide, rs4684677) may impact on the function of obestatin. In the present study, we tested the activity of native and Q90L obestatin to modulate ghrelin-induced food intake, GH secretion, cFos activity in GHRH and Neuropeptide Y (NPY) neurons and γ -aminobutyric-acid activity onto GHRH neurons.

Methodology/Principal findings: Food intake, GH secretion and electrophysiological recordings were assessed in C57BL/6 mice. cFos activity was measured in NPY-Renilla-GFP and GHRH-eGFP mice. Mice received saline, ghrelin or ghrelin combined to native or Q90L obestatin (30 nmol each) in the early light phase. Ghrelin stimulation of food intake and GH secretion varied considerably among individual mice with 59–77% eliciting a robust response. In these high-responders, ghrelin-induced food intake and GH secretion were reduced equally by native and Q90L obestatin. In contrast to *in vivo* observations, Q90L was slightly more efficient than native obestatin in inhibiting ghrelin-induced cFos activation within the hypothalamic arcuate nucleus and the nucleus tractus solitarius of the brainstem. After ghrelin injection, 26% of NPY neurons in the arcuate nucleus expressed cFos protein and this number was significantly reduced by co-administration of Q90L obestatin. Q90L was also more potent than native obestatin in reducing ghrelin-induced inhibition of γ -aminobutyric-acid synaptic transmission onto GHRH neurons.

Conclusions/Significance: These data support the hypothesis that Q90L obestatin partially blocks ghrelin-induced food intake and GH secretion by acting through NPY and GHRH neurons.

Citation: Hassouna R, Zizzari P, Viltart O, Yang S-K, Gardette R, et al. (2012) A Natural Variant of Obestatin, Q90L, Inhibits Ghrelin's Action on Food Intake and GH Secretion and Targets NPY and GHRH Neurons in Mice. PLoS ONE 7(12): e51135. doi:10.1371/journal.pone.0051135

Editor: Thierry Alquier, CRCHUM-Montreal Diabetes Research Center, Canada

Received: June 25, 2012; **Accepted:** October 29, 2012; **Published:** December 10, 2012

Copyright: © 2012 Hassouna et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by an INSERM Programme National de Recherche en Reproduction et Endocrinologie (PNRRE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: virginie.tolle@inserm.fr

Introduction

Ghrelin is a 28 amino acid peptide principally synthesized in the stomach and was originally described as the endogenous ligand of the Growth Hormone Secretagogue 1a Receptor (GHS-R1a) [1,2]. Ghrelin is the only orexigenic gastrointestinal peptide and one of its main functions is to stimulate growth hormone (GH) secretion [3,4]. Binding of ghrelin to the GHS-R1a, which relays most of ghrelin's biological effects, is made possible due to a post-translational acylation on its serine in position 3 [5,6]. GHS-R1a is highly expressed in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, a key region involved in the control of GH secretion and appetite but also in the brainstem that receives information from

gut vagal afferents [7,8]. Within the hypothalamus, ARC Neuropeptide Y (NPY) and Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) neurons express the GHS-R1a [9,10], and are a well-characterized target for ghrelin or GHS actions [11–13]. More recently, obestatin, a 23 amino acid peptide, derived from the cleavage of preproghrelin was discovered [14] and reported as an anorexigenic peptide ligand of the orphan receptor, GPR39, but these findings are controversial [15–18]. Nevertheless, when co-administered with ghrelin at equimolar doses, obestatin counteracts, for instance, ghrelin induced food intake and GH secretion in rodents [19]. The mechanism of action of obestatin and its interaction with ghrelin in the central nervous system

remain poorly understood. The effect of obestatin on ghrelin-induced GH secretion is not mediated at the pituitary level [14,19], suggesting that the interaction between ghrelin and obestatin is mainly mediated within the central nervous system. Indeed, recently, it was reported that obestatin blocks ghrelin-induced inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA) synaptic transmission onto GHRH neurons [20].

In humans, ghrelin/obestatin prepropeptide gene (*GHRL*) polymorphisms have been associated with pathologies linked to an unbalanced energy homeostasis like anorexia or bulimia nervosa [21,22]. One of those single nucleotide polymorphisms (SNP) (Q to L substitution in position 90 of preproghrelin, rs4684677) is located in the sequence encoding obestatin and anorexic patients carrying this SNP have a lower minimum body mass index (BMI) [23]. This polymorphism may thus influence the function of obestatin.

In this study, we compared the effect of native and Q90L obestatin in modulating ghrelin-induced food intake and GH secretion. These two parameters were measured after co-administration of the peptides in the light phase in *ad libitum* fed C57BL/6 mice. To define the central sites of interaction of these peptides, we assessed neuronal activation after co-administration of ghrelin and native or Q90L obestatin, in two key regions involved in regulation of GH secretion and/or food intake: the ARC in the hypothalamus and the NTS in the brainstem. Moreover, we investigated whether ghrelin and obestatin interacted directly on ARC NPY and GHRH neurons which relay ghrelin effects on food intake and GH release respectively [13,24–29].

Results

Inter-individual variations in the effects of ghrelin, or ghrelin combined with native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) to modulate food intake and GH secretion

The ability of human obestatin (hOb) and hObQ90L to inhibit ghrelin-induced food intake and GH secretion was tested after administration of equimolar doses (30 nmol ip) of ghrelin and hOb or hObQ90L during the light period in male C57BL/6 mice (Figure 1). We observed a high variability in the responses to peptides injections in individual mice and only a proportion responded to stimulation by ghrelin. Based on these observations, we determined a threshold to classify ghrelin-treated animals into either high or low responders. This was possible because each mouse was injected with each treatment in a cross-over designed manner. For food consumption, the threshold was defined as the mean value+3 standard deviations (SD) measured during 0–4 h after saline injection. For GH secretion, the threshold was defined as the mean value+3 standard deviations (SD) of the peak value recorded.

Fifty nine percent of mice increased their food consumption over a threshold of 0.42 g (high responders) 4 hours after ghrelin injection whereas 41% of mice did not (low responders) (Figure 1A). For GH secretion, 75% of mice exceeded the calculated threshold of 143 ng/ml (high responders) (Figure 1B). After co-administration of ghr+hOb or ghr+hObQ90L, the profile of the distribution of the responses was similar between high and low responders (Figure 1A and B). There was no difference between the two forms of obestatin in reducing the ghrelin-induced food intake or GH secretion when all animals were included.

Based on the above observations, the results for food intake and GH secretion were analyzed separately in high and low responders, the latter being shown in the Supporting Information.

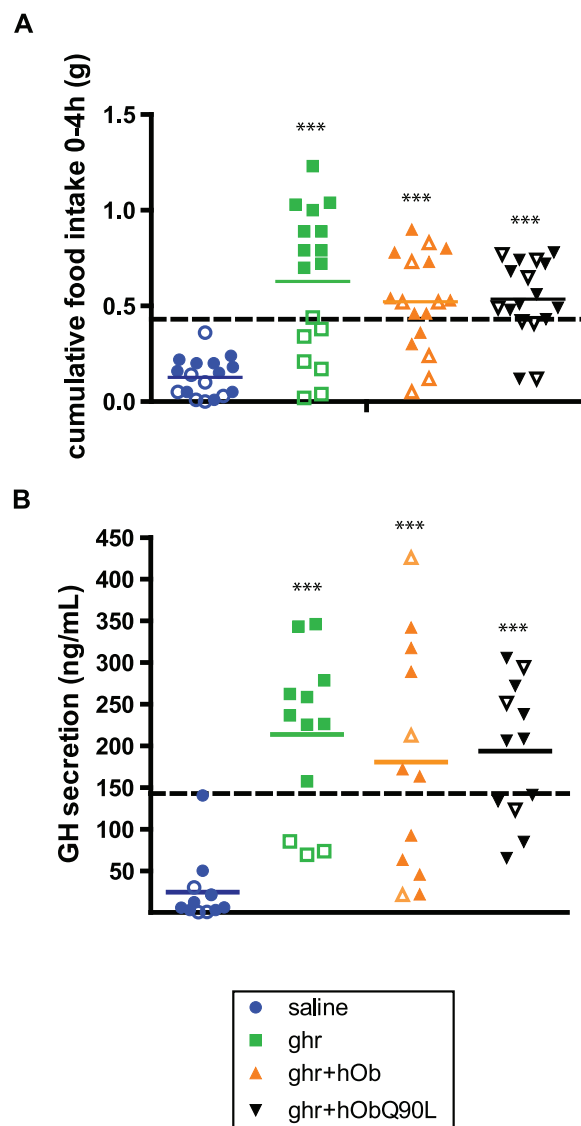


Figure 1. Differential effect of ghrelin on food intake and GH secretion in high and low-responders. (A) Cumulative 0–4 h food intake and (B) GH peak of secretion in individual mice injected i.p. with saline (circles), 30 nmol of ghr (squares), ghr+hOb (triangles) or ghr+hObQ90L (inverted triangles) (30 nmol). 4 hours after ghrelin injection, 59% of mice increased their food consumption over a threshold of 0.42 g (high responders, closed symbols) whereas 41% of mice did not (low responders, open symbols) responders. The dotted line represents the threshold for ghrelin response. Bar represents mean of data. *** $P < 0.0001$ vs saline. doi:10.1371/journal.pone.0051135.g001

Native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) reduce ghrelin-induced food intake in high responders

Feeding behavior was monitored after Ghr and/or after co-administration of Ghr+hOb/hObQ90L in male C57BL/6 mice. In high responders only, hOb and hObQ90L attenuated the ghrelin-induced cumulative food intake within 4 hours following treatments and the activity of the two forms of obestatin was equivalent (Figure 2A). Within the first hour following the injection, however, neither hOb nor hObQ90L inhibited the effects of ghrelin.

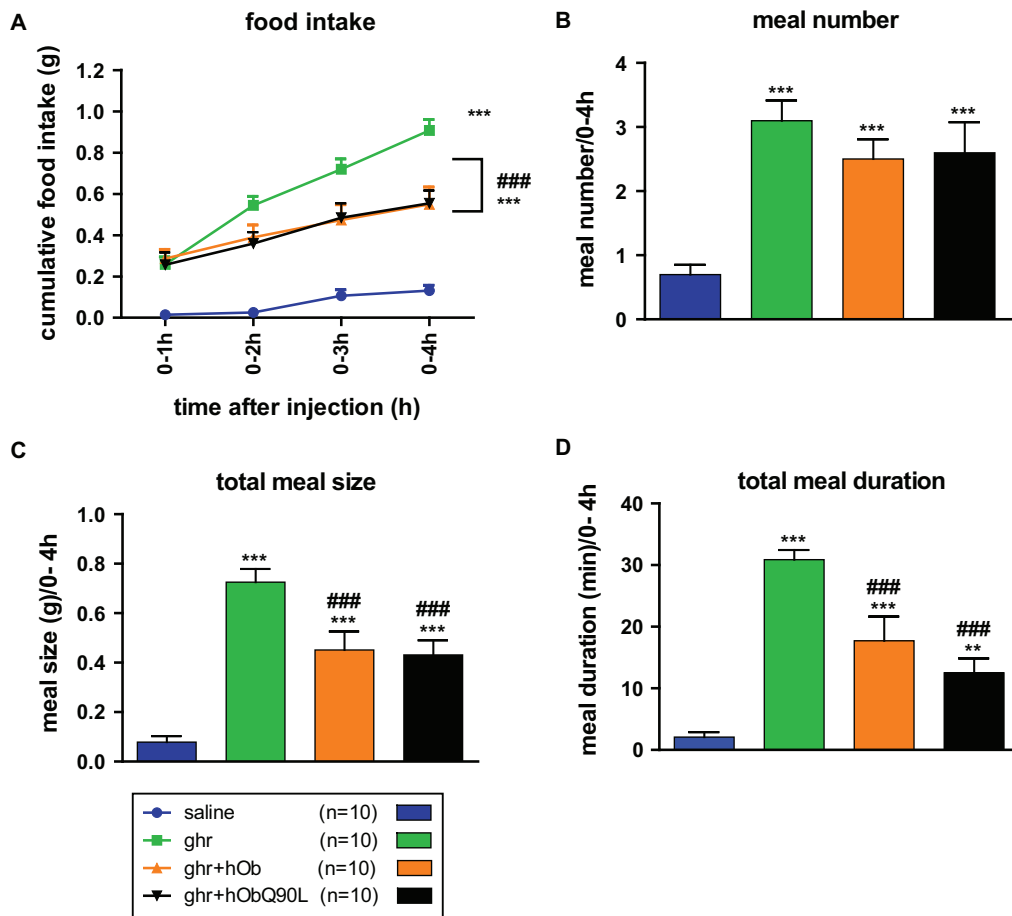


Figure 2. Effect of native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) cumulative food intake and meal pattern in high responders C57BL/6 mice. (A) Mean cumulative 4 h food intake after the different treatments in high responders. (B–D) Meal number, size and duration within 4 h following the injections in high responders. Data represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs saline, *** $P < 0.001$ vs saline, ### $P < 0.001$ vs ghr. doi:10.1371/journal.pone.0051135.g002

The analysis of the meal pattern revealed that the inhibitory effect of both forms of obestatin was due to a decrease in meal size and duration (Figure 2B–D). The effect of hObQ90L appeared to be slightly more pronounced than hOb more particularly in reducing ghrelin's effect on total meal duration.

In low responders, although ghrelin did not elicit an increase in cumulative food consumption (Figure 1A), mice did respond to co-administration of ghr+hOb/hObQ90L notably by increasing meal number, size and duration (Figure 1B–D). hOb or hObQ90L injected alone did not affect food intake or meal pattern (Data not shown).

Native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) reduce ghrelin-induced GH secretion in high responders

The ability of hOb and hObQ90L to inhibit ghrelin-induced GH secretion was tested after administration of equimolar doses (30 nmol ip) of ghrelin and hOb/hObQ90L during the light period in both male and female mice (Figure 3). In high responders only, ghrelin induced an increase in the amplitude of GH secretion and this was significantly reduced by co-administration of Ghr+hOb but not Ghr+hObQ90L 20 minutes following the injection only (Figure 3A). Due to the inter-individual variability in all groups, the area under the curve (AUC) analysis showed a small

inhibitory effect of both forms of obestatin although not statistically different from the ghrelin group (Figure 3B). There was no significant difference observed in the responses to the two forms of obestatin. In low responders, no statistical differences were observed between treatments (Figure 2).

Q90L obestatin (hObQ90L) reduces ghrelin-induced cFos immunoreactivity in ARC and NTS

cFos immunoreactive cells were quantified from 2.2/1.6 mm of the interaural line for the ARC and from $-3.78/-3.98$ mm of the interaural line for the NTS. Representative micrographs are illustrated on Figure 4A and C for ARC and NTS respectively. The increased number of cFos immunoreactive cells after ghrelin injection was significantly reduced by hObQ90L in both ARC (Figure 4B) and NTS (Figure 4D). The effects of both human (hOb) and rat (rOb) obestatin on cFos activation were pooled as no differences were observed between both forms (data not shown).

Q90L obestatin (hObQ90L) reduces ghrelin-induced cFos immunoreactivity in ARC NPY neurons

GFP positive cell number was quantified from 2.2/1.6 mm of the interaural line in the ARC. The number of GFP-positive neurons did not differ between the treatment groups (Figure 5A

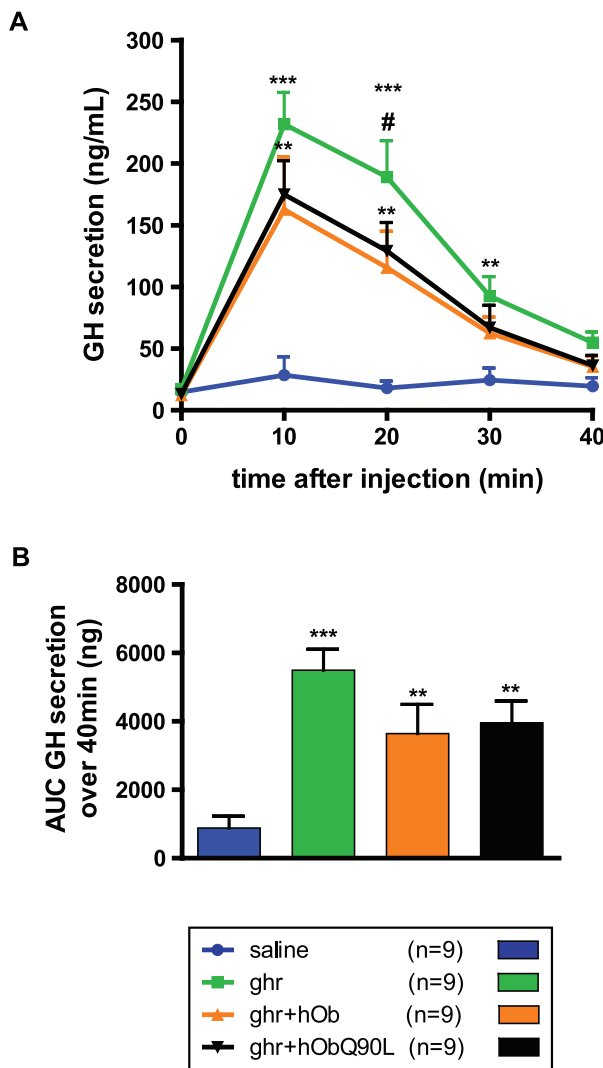


Figure 3. Effect of native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) GH secretion in high responders C57BL/6 mice. (A) Mean GH secretion in response to the different treatments in high responders. (B) Area Under the curve of GH secretion over 40 minutes in high responders. Data represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs saline, *** $P < 0.001$ vs saline, # $P < 0.05$ vs ghr+hOb. doi:10.1371/journal.pone.0051135.g003

and Table S1). Ghrelin induced a significant increase in the number of NPY neurons expressing cFos compared to saline-injected animals (26% vs 2% of NPY neurons, respectively) (Figure 5B). In NPY neurons, co-localization with cFos was reduced significantly to 11% with hObQ90L but not with hOb (Figure 5A). Only 8% of GHRH neurons expressed cFos following ghrelin (Table S1). This was not significantly different from controls due to the lower proportion of ghrelin-activated neurons and the inter-individual variability.

Native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) inhibit the ghrelin-induced decrease in evoked GABA synaptic responses in GHRH neurons

Because ghrelin has been shown to reduce GABA synaptic transmission to GHRH neurons, evoked GABA synaptic responses were recorded in GHRH neurons expressing GFP. Both native

and hObQ90L obestatin dose-dependently inhibited ghrelin effects on GABA transmission (Figure 6). hObQ90L obestatin was 2.5 times more potent in inhibiting the ghrelin-induced decrease of evoked GABA synaptic response in GHRH neurons (EC_{50} 18 μ M for hObQ90L and 66.4 μ M for hOb).

Discussion

In the present study, we observe that a natural variant of human obestatin, hObQ90L, is slightly more active than the native peptide to suppress some of ghrelin's biological effects in mice that respond to ghrelin. Indeed, only 59% and 75% of ghrelin-treated mice responded to ghrelin's actions on food intake and GH secretion, respectively. To our knowledge, this is the first report showing that i.p injection of ghrelin does not always lead to a major increase in food consumption or GH secretion. As the effects of obestatin can only be observed in high responders, inter-individual heterogeneity in ghrelin responses may explain why several studies failed to see any inhibitory action of obestatin on ghrelin-induced food intake or GH secretion [30,31]. Controversy concerning the physiological significance or pharmacological actions of obestatin is partly due to the difficulty to reproduce published data and to the lack of concordant information in the literature [14,15,18,30,31]. Thus the pharmacological action of obestatin in reducing ghrelin-induced food intake and GH secretion [19] appears to depend upon the ability of individual animals to respond to ghrelin. For instance, ghrelin-induced cFos activation or feeding has been shown to be different in fed and fasted states [19,32]. In the present study, we were unable to demonstrate any correlation between the food consumed within 15 minutes prior to peptide injections and ghrelin-induced feeding ($R^2 = 0.001$, $P = 0.8870$). Thus, biological parameters, like nutritional status or stress level, could impact on the response to ghrelin but this remains to be demonstrated.

ObQ90L polymorphism is found in the general population with a frequency of 2–14%. Although this single nucleotide polymorphism does not appear to be associated with metabolic or eating disorders according to population studies [33–36], anorexic patients carrying this SNP have a lower minimum body mass index (BMI) [23]. Together with the current data, it may suggest that ObQ90L polymorphism, located in the sequence encoding for obestatin, has a stronger inhibitory action on some of the circuits regulating feeding compared to the natural peptide, which has been found to be a functional ghrelin antagonist previously [19,20].

Although no significant difference between native and Q90L obestatin is observed on cumulative food intake over 4 hours, analysis of meal structure reveals that hObQ90L, at the dose of 30 nmol, has a slightly larger effect in reducing total meal duration than the natural peptide. Real differences in potencies between both peptides cannot be ascertained from analysis of feeding pattern as dose-responses were not performed. At any rate, the results indicate that native and Q90L obestatin partially reduce ghrelin-induced food intake by modulating satiation (i.e meal termination). A suppressive effect on the ghrelin-induced food intake is not observed within the first hour following the injection, suggesting that the inhibitory action of both native and Q90L obestatin on ghrelin-induced food intake is delayed. However in a previous study [19], the inhibitory effect of obestatin on the ghrelin-induced food intake was observed immediately following the injection. Such a discrepancy could be related to different experimental paradigms, injections being performed just before the dark phase in the previous study and during the light phase herein. For ghrelin-induced GH secretion, inhibition by

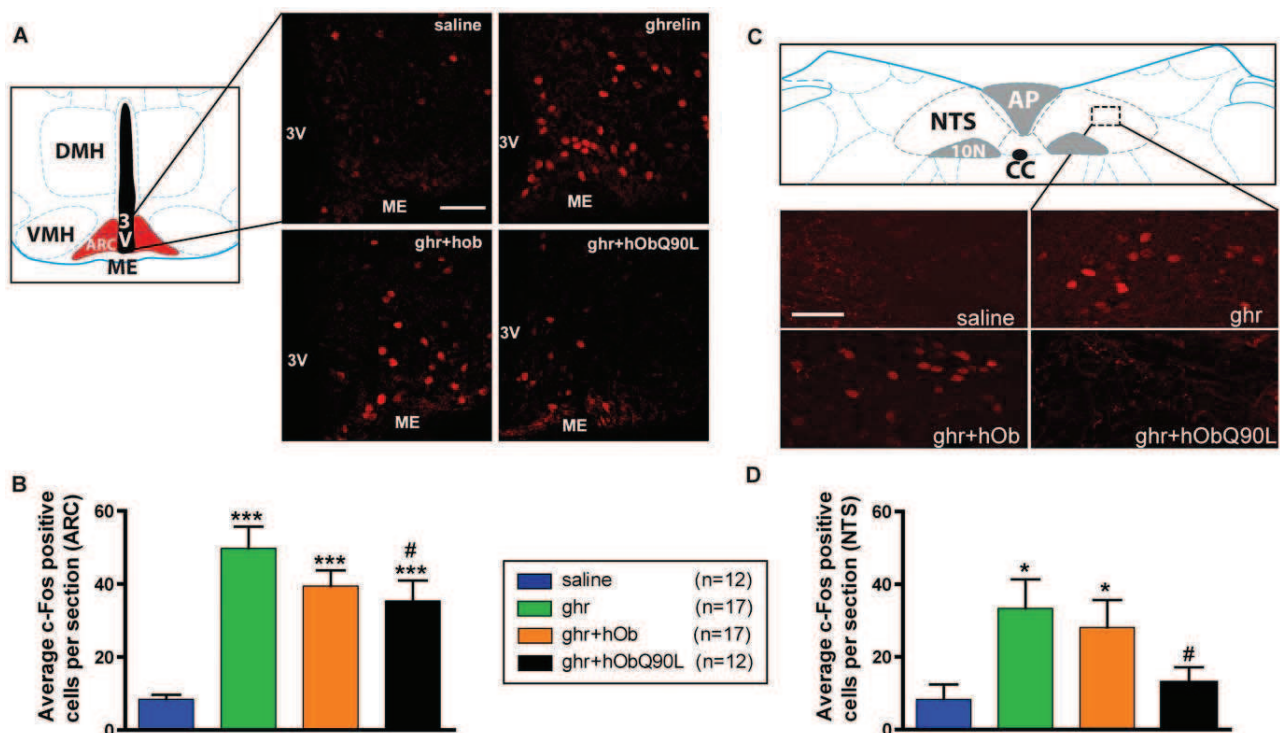


Figure 4. Effect of native (h/rOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) cFos immunoreactivity in C57BL/6 mice in the arcuate nucleus (ARC) and in the nucleus tractus solitarius (NTS). (A and C) Representative confocal photomicrophotographs of the cFos staining after each treatment in coronal sections at 1.9 mm of the interaural line in the ARC and -3.78 mm of the interaural line in the NTS; (B and D) Average of cFos-positive nuclei per section after the different treatments between 2.2/1.6 mm of the interaural line for the ARC and between -3.78/-3.98 mm of the interaural line for the NTS. Data represent mean \pm SEM. *** P <0.001 vs saline, * P <0.05 vs saline, # P <0.05 vs ghr. Scale bar represents 100 μ m in the ARC and 50 μ m in the NTS. 3V: third ventricle, ME: median eminence, DMH: Dorsomedial Hypothalamic nucleus, VMH: Ventromedial Hypothalamic nucleus, ARC: Arcuate nucleus, NTS: Nucleus Tractus Solitarius, AP: Area Postrema, 10N: Dorsal Motor Nucleus of Vagus, cc: central canal.

doi:10.1371/journal.pone.0051135.g004

hObQ90L is not more pronounced than native obestatin. In addition, we were unable to demonstrate an effect of obestatin *per se*, confirming most of previous data [22].

In the absence of an identified obestatin receptor and adequate tools to study obestatin function (agonists or antagonists), the mechanism of action of obestatin and its interaction with ghrelin in the central nervous system have remained poorly understood. We thus tested for the first time whether obestatin could modulate ghrelin effects by acting on the same neuronal populations synthesizing the orexigenic peptide NPY. ARC NPY neurons are a well-characterized target for ghrelin actions in the hypothalamus. In the rat, in-situ hybridization studies show colocalization between the GHS-R and NPY (and GHRH) mRNAs [9,10]. In addition, intravenous administration of GHRP-6, a synthetic GHS, activates cFos in GHRH and NPY neurons: around half of the activated cells are NPY containing and around one quarter are GHRH containing cells [13]. Here, we describe for the first time by using NPY-Renilla-GFP mice that i.p administration of ghrelin activates 26% of NPY neurons in the ARC while 53% of cFos immunoreactive cells are GFP positive. This is consistent with previous results showing that a majority of cFos immunoreactive cells after i.p injection of ghrelin express NPY mRNA in mice [11]. The proportion of NPY neurons expressing cFos is robustly reduced from 26 to 11% by Q90L obestatin, demonstrating that the actions of this natural variant are relayed through this population of orexigenic neurons. In addition, the activation of NTS neurons, another target of ghrelin, is also

more reduced by Q90L obestatin than with the native peptide. As the NTS relays information about satiety and satiation, these data are consistent with an effect of obestatin on ghrelin-induced increase in meal size and duration.

Only a small proportion of GHRH-eGFP neurons were activated by ghrelin treatment in the current study (8% of GHRH-eGFP neurons are cFos positive). Consequently, a significant inhibitory action of obestatin on GHRH neurons using cFos quantification could not be demonstrated, despite the fact that GHRH neurons express the GHS-R [9,10] and GHRH does play a role in ghrelin-induced GH secretion in rats [24]. In addition, this contrasts with data obtained in rats showing that the synthetic GHSs, GHRP-6 and KP-102, activate cFos in a significant number of GHRH neurons, although the proportion of GHRH cells expressing cFos mRNA was very different with both GHS (38% with GHRP-6 and 20% with KP-102) [13,37]. Thus differences in activated cells from one study to another may be due to species differences, measurement of mRNA versus GFP-positive cells or to differences in the mechanism of actions of various GHS-R ligands. A recent study from our laboratory using patch-clamp recording in mice demonstrated that ghrelin activates 44% of recorded GHRH neurons by inhibiting GABA synaptic transmission onto GHRH neurons and this was inhibited by obestatin [20]. The discrepancies between the cFos data and single-cell recording following ghrelin stimulation may be explained by differences in the experimental conditions and techniques used (electrically induced synaptic responses after direct

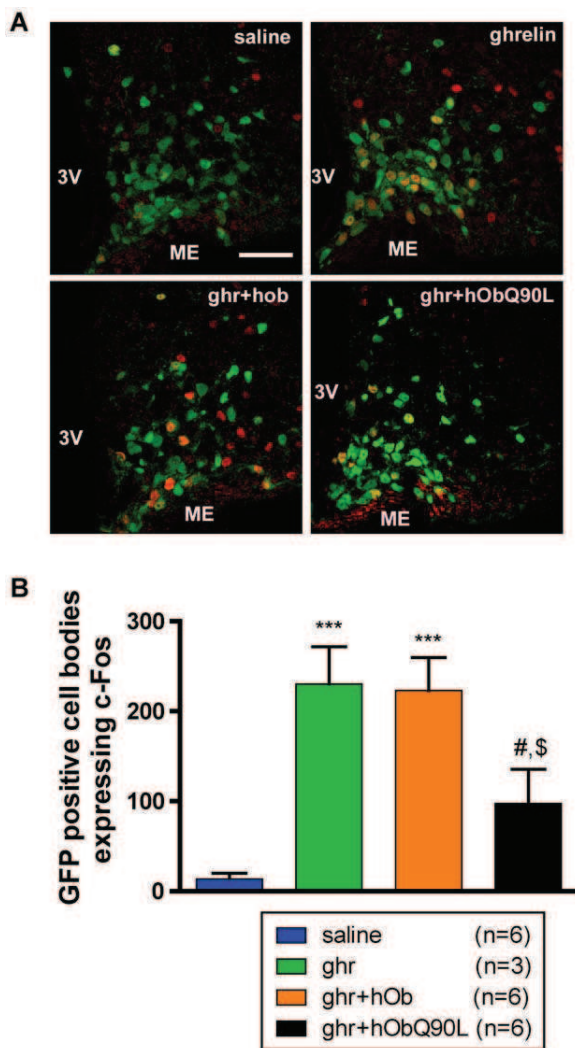


Figure 5. Effect of native (h/rOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) cFos immunoreactivity in arcuate nucleus (ARC) NPY neurons in C57BL/6 mice. (A) Representative confocal photomicrophotographs of hypothalamic coronal sections showing the merged images containing cFos staining in red and NPY-GFP cells in green after each treatment at 1.9 mm of the interaural line in the ARC. (B) Quantification of NPY-GFP positive cell bodies expressing cFos in the ARC after the different treatments. Data represent mean \pm SEM. *** P <0.001 vs saline, # P <0.05 vs ghr, \$ P <0.01 vs ghr+hOb. Scale bar represents 100 μ m, 3V: third ventricle, ME: median eminence. doi:10.1371/journal.pone.0051135.g005

application of ghrelin on hypothalamic slices versus cFos activation after peripheral ghrelin administration). Thus we compared the effects of native and Q90L obestatin using patch-clamp recording and demonstrated that Q90L obestatin blocks ghrelin-induced decreases in GABA synaptic transmission more potently than native obestatin. In contrast to the behavioral and physiological observations in mice, cellular assays appear to reveal a difference between native and Q90L obestatin.

In conclusion, hObQ90L not only retains its ability to reduce ghrelin effects on food intake and GH secretion, in mice that respond to ghrelin, but it also has a stronger effect than native obestatin in inhibiting neuronal activity in key target circuits regulating feeding or GH secretion. Substitution of one amino-

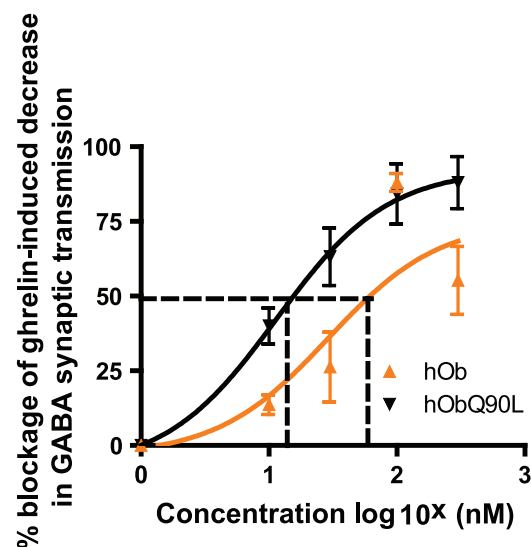


Figure 6. Effect of native (hOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on the ghrelin-induced (Ghr) decrease of evoked GABA synaptic responses in GHRH neurons. Dose response curves for hOb and hObQ90L (10, 30, 100 and 300 nM) represented on a semi-logarithmic scale. Ghrelin was applied at 300 nM. Data represent mean \pm SEM. The dotted line represents the EC₅₀ values, 18 μ M and 66.4 μ M for hObQ90L and hObhOb respectively. The two curves show significant differences (comparing best fit values of two groups using Student T-test, P <0.001). doi:10.1371/journal.pone.0051135.g006

acid by another has previously been shown to modify the biological activity of peptides [38,39]. These results extend our knowledge about the mechanism of action of this functional ghrelin antagonist and are in keeping with clinical data showing that, in anorexic patients, this variant was more frequent amongst women with the lowest body mass index [23].

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the Animal Experimentation Committee of Paris Descartes University.

Animals

Adult C57Bl/6 male mice (Charles River) (11 weeks old upon arrival) were housed in individual cages for the food intake experiments. Heterozygous GHRH-eGFP transgenic mice [40] and NPY-Renilla GFP transgenic male and female mice [41] were obtained by crossing transgenic to C57Bl/6 mice. The transgenic offspring were genotyped by PCR amplification of tail DNA. All animals were housed in a room under controlled illumination (7:00 AM to 7:00 PM) and temperature (22–24°C) and had free access to food and water. All experiments were started between 9:30 AM and 10:30 AM. Male and female mice were used for GH response and immunohistochemistry experiments and only males were used for the feeding and electrophysiological experiments. No sex differences were observed.

Acute injections of peptides

For the food intake and GH secretion experiments, mice received an intraperitoneal (i.p) injection of saline, rat acyl-ghrelin

(ghr), ghrelin+human obestatin (ghr+hob) and ghrelin+human Q90L obestatin (ghr+hobQ90L), 30 nmol each (NeoMPS Strasbourg, France). Experiments were repeated in a crossover designed manner so that each mouse received all treatments randomly separated by two days of washout. For the immunohistochemical experiments, separate groups of mice received an i.p injection of either saline, rat acyl-ghrelin, ghr+rat or human obestatin (r/hOb), or ghr+hobQ90L (30 nmol each). 90 minutes later the animals were anesthetized and perfusion-fixed (see below).

Food intake monitoring and meal patterns analysis

Mice were habituated to single housing and to the automated drinking/feeding station (TSE systems, GmbH, Germany) for 1 week before the beginning of the experiment. On each experimental day, mice received an i.p injection of the peptides. Feeding behavior was recorded continuously for 24 hours after the injection by means of high precision sensors, attached to the top of the cage.

Meal patterns were analyzed using the following definition: a meal consists of the consumption of 0.03 g of food separated from the next feeding episode by at least 10 minutes (intermeal interval, [42–44]). For each mouse, the meal number, the total meal size (g) and the total meal duration (minutes) were measured for 4 hours following the injection of the peptides.

Repeated blood samplings for GH assay

Mice were habituated to single housing before the beginning of the experiment and handled in order to minimize stress. 4 μ l of the whole venous blood was obtained from the tail vein every ten minutes [45], for one hour after the i.p injection of the peptides. Blood samples were collected in 116 μ l of the Enzyme Immuno-Assay (EIA) GH buffer (PBS-0.05% tween) and kept on ice until the end of experiment and then transferred to -20°C for storage before further analysis.

Whole blood GH concentrations were evaluated by EIA as previously described [45].

Immunohistochemistry for cFos and co-localization studies

GHRH and NPY neurons were visualized using GFP fluorescence. Specific co-localization experiments between GHRH or NPY and cFos were performed as follows. Ninety minutes after i.p injection of the peptides, the mice were anaesthetized (5.47 mg/30 g BW of sodium pentobarbital) and perfused transcardially with 0.9% saline followed by fixative containing 4% paraformaldehyde (PFA) in PB (0.1 M). The brains were removed, post-fixed in 4% PFA in PB for 2 hours at room temperature and cryoprotected in 30% sucrose for 2 days at 4°C before freezing in 2-methyl-butane (at -35°C). Serial coronal sections, 25 μ m thick, were cut using a freezing microtome (Frigomobile, Leica, Wetzlar, Germany). Immunofluorescence was performed on free-floating sections, separated by 100 μ m for the entire rostro-caudal extent of the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and the nucleus solitary tract (NTS) of the brainstem. The sections were first incubated with primary antibody: anti-cFos raised in rabbit (1:20000, Ab-5, Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) and then with Cy3 conjugated donkey anti-rabbit antiserum (1:800, Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA). Sections were examined using a Zeiss Axioplan microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). The number of cFos positive cell nuclei and GFP positive cell bodies were counted bilaterally under a $40\times$ magnification, in ARC (interaural line: 2.2 to 1.6 mm from

Paxinos and Watson's mouse brain atlas, 1997) and in the NTS (interaural line: -3.78 to -3.98 mm). GFP positive cell bodies expressing cFos were visualized using a confocal SP5 microscope (Leica, Wetzlar, Germany). The number of cells showing co-localization was determined using the Image-J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) on series of continuous optical sections with 0.5 μ m increment along the z-axis of the section under a $40\times$ magnification. Confocal images presented were obtained from individual optical slices.

Electrophysiological Experiments

Electrophysiological experiments were conducted as described previously [13]. Briefly, recordings were performed at room temperature on 200 μ m thick hypothalamic coronal slices from 8–13 week-old male GHRH-eGFP transgenic CB57Bl/6J placed in a bath solution containing 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , 10 mM Glucose, 10 μ M CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, AMPA-R antagonist) and 50 μ M D-AP-5 (2-amino-5-phosphonopentanoate, NMDA-R antagonist), pH 7.3, 300–310 mOsm/L, and perfused at a rate of 2 ml/minutes. GHRH-eGFP ARC neurons were visually identified by fluorescent microscopy. To record electrically induced synaptic responses, patch recording pipettes were filled with 131 mM $\text{CH}_3\text{O}_3\text{SCs}$, 6 mM CsCl (intracellular Cs was used to block potassium channels), 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 1.1 EGTA, 5 mM Lidocaine N-ethyl bromide (QX-314, to block sodium channels), 4 mM ATP-Mg, pH 7.3 (adjusted with 1 M CsOH) and 290–300 mOsm/L. Neurons were voltage-clamped at -20 mV. GABA synaptic responses were recorded using an Axopatch 1D amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA), digitized using a Digidata 1200 interface (Axon Instruments) and stored on a computer. On-line analysis and storage of current data into data files performed using the pClamp 6.0.4 software from Axon Instruments. In all experiments, stimuli (0.2 msec duration, 0.3–1 mA intensity, 0.25 Hz) were applied to determine the postsynaptic response amplitudes and to measure the time-dependent effects of drugs. Drugs were diluted in the external medium to the desired concentration and applied by bath perfusion (ghrelin: 300 nM, hOb/hObQ90L: 10, 30, 100 and 300 nM). After acquisition of a 10 minutes baseline of current amplitudes, hOb and hObQ90L were applied for 5–6 minutes, followed by 10 minutes washing periods. Amplitudes of induced synaptic currents were normalized relative to the baseline prior to the application of drugs.

Statistical analysis

Values are given as mean \pm SEM, and statistical analysis were performed using ANOVA, repeated measure ANOVA followed by a Fisher *post-hoc* test when the p value of the ANOVA was significant ($P < 0.05$) using statview software (SAS institute Inc., Cary, NC, USA).

Areas Under the Curve (AUC) were calculated by the trapezoidal method.

The effects of the drugs in electrophysiological experiments were determined by comparing the best-fit values of two dose-response curves using Student T-test in the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The effect were different if $P < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 (A) Mean cumulative 4 h food intake after the different treatments in low responders. (B–D) Meal number, size

and duration within 4 h following treatment in low responders. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs saline, ** $P < 0.01$ vs saline, # $P < 0.05$ vs ghr. (EPS)

Figure S2 (A) Mean GH secretion in response to the different treatments in low responders. (B) Area Under the curve of GH secretion over 4 h in low responders. Data represent mean \pm SEM. (EPS)

Table S1 Effect of native (h/rOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) cFos immunoreactivity in ARC NPY and GHRH neurons in C57BL/6 mice. (EPS)

References

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. pp. 656–660.
- Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, et al. (2000) Identification and Characterization of a Novel Gastric Peptide Hormone: The Motilin-Related Peptide. *Gastroenterology*. pp. 395–405.
- Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, Epelbaum J, et al. (2001) In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. pp. 54–61.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. pp. 908–913.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, et al. (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. pp. 6320–6325.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*. pp. 387–396.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, et al. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 23–29.
- Katayama M, Nogami H, Nishiyama J, Kawase T, Kawamura K (2000) Developmentally and regionally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor mRNA in rat brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 72: 333–340.
- Willems MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*. pp. 306–316.
- Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD (1998) Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. pp. 4420–4423.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y (2002) Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*. pp. 47–51.
- Dickson SL, Leng G, Robinson IC (1993) Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. *Neuroscience* 53: 303–306.
- Dickson SL, Luckman SM (1997) Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 138: 771–777.
- Zhang JV (2005) Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science*. pp. 996–999.
- Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Goazigo ARL, et al. (2007) Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake". *Science*. pp. 766c–766c.
- Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, et al. (2006) GPR39 Signaling Is Stimulated by Zinc Ions But Not by Obestatin. *Endocrinology*. pp. 13–20.
- Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, Schoofs L, Luyten W (2006) Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp. 21–25.
- Anнемie VD, Debby VD, Valentijn V, Bart DS, Walter L, et al. (2009) Central administration of obestatin fails to show inhibitory effects on food and water intake in mice. *Regulatory Peptides: Elsevier B.V.* pp. 77–82.
- Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*. pp. 1648–1653.
- Feng DD, Yang SK, Loudes C, Simon A, Al-Sarraf T, et al. (2011) Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *European Journal of Neuroscience*. pp. 732–744.
- Ando T, Komaki G, Naruo T, Okabe K, Takii M, et al. (2006) Possible role of preproghrelin gene polymorphisms in susceptibility to bulimia nervosa. *Am J Med Genet*. pp. 929–934.
- Hassouna R, Zizzari P, Tolle V (2010) The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of GH secretion, body composition and food intake. *Journal of Neuroendocrinology*. pp. 794–804.
- Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, Foulon C, Kipman A, et al. (2007) Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: Association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology*. pp. 106–113.
- Tannenbaum GS (2003) Interrelationship between the Novel Peptide Ghrelin and Somatostatin/Growth Hormone-Releasing Hormone in Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion. *Endocrinology*. pp. 967–974.
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, et al. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. pp. 227–232.
- Toshinai K (2003) Ghrelin-Induced Food Intake Is Mediated via the Orexin Pathway. *Endocrinology*. pp. 1506–1512.
- Chen HY (2004) Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. *Endocrinology*. pp. 2607–2612.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*. pp. 948–956.
- Briggs DI, Enriori PJ, Lemus MB, Cowley MA, Andrews ZB (2010) Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Arcuate NPY/AgRP Neurons. *Endocrinology*. pp. 4745–4755.
- Seoane LM, Al-Massadi O, Pazos Y, Pagotto U, Casanueva FF (2006) Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J Endocrinol Invest*. pp. RC13–15.
- Nogueiras R, Plüger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, et al. (2006) Effects of Obestatin on Energy Balance and Growth Hormone Secretion in Rodents. *Endocrinology*. pp. 21–26.
- Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12: 1047–1049.
- Hinney A, Hoch A, Geller F, Schäfer H, Siegfried W, et al. (2002) Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp. 2716.
- Larsen L, Gjesing A, Sorensen T, Hamid Y, Echwald S, et al. (2005) Mutation analysis of the preproghrelin gene: No association with obesity and type 2 diabetes. *Clinical Biochemistry*. pp. 420–424.
- Steinle NI (2005) Variants in the Ghrelin Gene Are Associated with Metabolic Syndrome in the Old Order Amish. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp. 6672–6677.
- Cellini E, Nacmias B, Breclj-Anderlüh M, Badia-Casanovas A, Bellodi L, et al. (2006) Case-control and combined family trios analysis of three polymorphisms in the ghrelin gene in European patients with anorexia and bulimia nervosa. *Psychiatr Genet*. pp. 51–52.
- Kamegai J, Minami S, Sugihara H, Hasegawa O, Higuchi H, et al. (1996) Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 137: 2109–2112.
- Li Y (2006) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest*. pp. 506–511.
- Mejias R, Adamczyk A, Anggono V, Niranjana T, Thomas GM, et al. (2011) Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. pp. 4920–4925.
- Balthasar N, Mery PF, Magoulas CB, Mathers KE, Martin A, et al. (2003) Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice: a ventral hypothalamic network. *Endocrinology* 144: 2728–2740.
- van den Pol AN, Yao Y, Fu LY, Foo K, Huang H, et al. (2009) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a

Acknowledgments

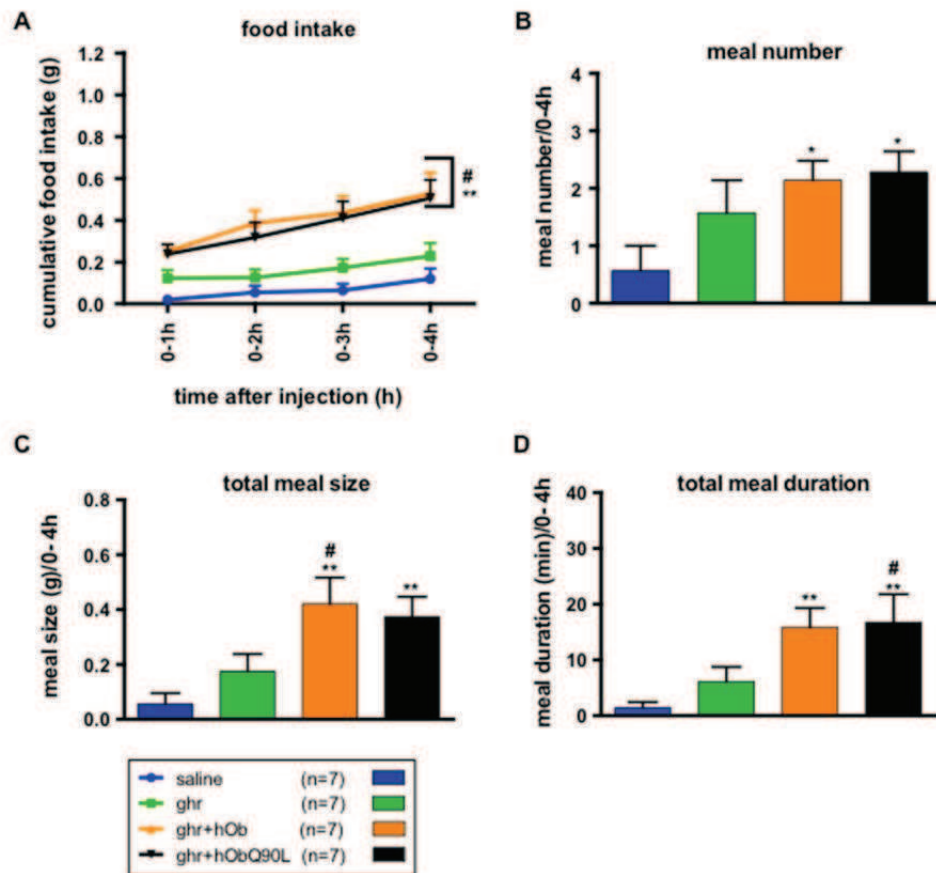
We are grateful to Dr ICAF Robinson (National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, England) for providing the GHRH-EGFP mice and to Dr Parlow (NHPP, Los Angeles, USA) for the GH reagents. We are thankful to Alice Coughon for animal care.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RH VT. Performed the experiments: RH PZ OV SY CV EB. Analyzed the data: RH PZ SY RG JE VT. Contributed reagents/materials/analysis tools: PZ OV. Wrote the paper: RH VT. Revised the manuscript: JE.

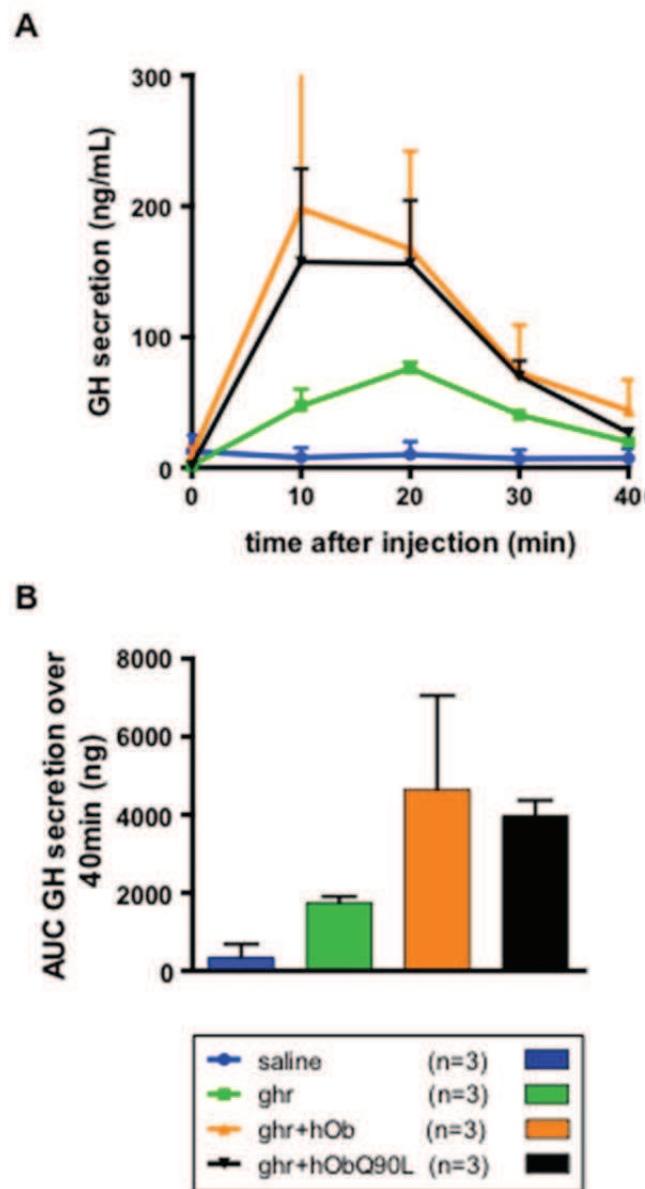
- novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *J Neurosci* 29: 4622–4639.
42. Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, et al. (2010) Activation of brain somatostatin 2 receptors stimulates feeding in mice: analysis of food intake microstructure. *Physiol Behav* 101: 614–622.
 43. Wang L, Stengel A, Goebel M, Martinez V, Gourcerol G, et al. (2011) Peripheral activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits food intake and alters meal structures in mice. *Peptides* 32: 51–59.
 44. Yu Y, South T, Huang XF (2009) Inter-meal interval is increased in mice fed a high whey, as opposed to soy and gluten, protein diets. *Appetite* 52: 372–379.
 45. Steyn FJ, Huang L, Ngo ST, Leong JW, Tan HY, et al. (2011) Development of a method for the determination of pulsatile growth hormone secretion in mice. *Endocrinology* 152: 3165–3171.

SUPPLEMENTARY FIGURE S1



Supplementary Figure S1. (A) Mean cumulative 4h food intake after the different treatments in low responders. (B-D) Meal number, size and duration within 4h following treatment in low responders. Data represent mean±SEM. *: $p < 0.05$ vs saline, **: $p < 0.01$ vs saline, #: $p < 0.05$ vs ghr.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2



Supplementary Figure S2. (A) Mean GH secretion in response to the different treatments in low responders. (B) Area Under the curve of GH secretion over 4h in low responders. Data represent mean \pm SEM.

SUPPLEMENTARY TABLE S1

Genotype	Treatment	n	GFP positive cell bodies	GFP positive cell bodies expressing cFos	% of GFP positive cell bodies expressing cFos	% of cFos expressing cells GFP positive
Renilla-NPY-GFP	Saline	6	933 \pm 60	14 \pm 7	2 \pm 1	13 \pm 4
	Ghrelin	3	816 \pm 49	230 \pm 41 ^a	26 \pm 5 ^a	53 \pm 6 ^a
	Ghr+hob	6	796 \pm 136	223 \pm 36 ^a	33 \pm 6 ^a	63 \pm 9 ^a
	Ghr+hobQ90L	6	835 \pm 71	98 \pm 38 ^{b,c}	11 \pm 4 ^c	34 \pm 10 ^c
GHRH-eGFP	Saline	7	202 \pm 26	1 \pm 0.4	0 \pm 0.2	1 \pm 1
	Ghrelin	6	189 \pm 32	16 \pm 9	8 \pm 4	4 \pm 2
	Ghr+hob	5	175 \pm 38	6 \pm 3	4 \pm 2	2 \pm 1
	Ghr+hobQ90L	4	168 \pm 10	8 \pm 5	5 \pm 4	2 \pm 1

a: p<0.05 vs saline, b: p<0.05 vs ghr and c: p<0.05 vs ghr+hOb.

Supplementary Table S1. Effect of native (h/rOb) and Q90L obestatin (hObQ90L) on ghrelin-induced (Ghr) cFos immunoreactivity in ARC NPY and GHRH neurons in C57BL/6 mice.

RESULTATS NOTABLES

Cette étude montre que le variant naturel de l'obestatine, l'obestatine Q90L, préserve sa capacité à inhiber les effets de la ghréline sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH.

De façon intéressante, cette étude a également permis de révéler l'existence de différences dans la réponse à la ghréline que ce soit sur la prise alimentaire, la sécrétion de GH ou l'activation neuronale au niveau de l'ARC. Ainsi, l'action inhibitrice de l'obestatine, qu'elle soit native ou portant le polymorphisme Q90L, n'est observable que chez les souris répondant bien à la ghréline.

Ce dernier résultat contribue à alimenter la discussion sur le rôle de l'obestatine. Son rôle « antagoniste » sur les actions de la ghréline, sur le comportement alimentaire et la sécrétion de GH, est ici confirmé ainsi que l'absence de rôle physiologique *per se*.

Le variant Q90L de l'obestatine apparaît de plus comme étant plus fort que l'obestatine native dans son effet modulateur de la ghréline notamment au niveau de ses cibles neuronales. Ainsi, l'obestatine Q90L réduit de façon plus significative que l'obestatine native l'activation neuronale induite par la ghréline au niveau des neurones à NPY mais également au niveau du NTS dans le tronc cérébral et est plus puissante pour inhiber la diminution de la transmission synaptique de GABA induite par la ghréline au niveau des neurones à GHRH. Ainsi le variant Q90L de l'obestatine possède des effets plus importants que l'obestatine native pour inhiber l'activité neuronale induite par la ghréline au niveau de circuits clés de la régulation de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH.

Partie II: Rôle de la préproghréline endogène dans le contrôle de la sécrétion de GH et de la prise alimentaire.

Situation du sujet et objectif de l'étude

Alors que l'action stimulatrice de la ghréline exogène sur la sécrétion de GH est bien documentée chez le rat comme chez la souris, celle de la ghréline endogène et de ses peptides dérivés reste encore à déterminer. L'obestatine semble, quant à elle, ne pas avoir de rôle *per se* dans la régulation de la sécrétion de GH alors que des études ont montré son action inhibitrice sur la sécrétion de GH induite par la ghréline.

Le but de cette étude a été de déterminer si l'absence des peptides endogènes dérivés de la préproghréline, et notamment l'absence de ghréline acylée, pouvait avoir un impact dans le contrôle de la sécrétion pulsatile de GH.

Pour ce faire, nous avons étudié l'activité de l'axe GH/IGF-1 chez des souris déficientes en préproghréline (*ghrl*^{-/-}) qui n'expriment ni ghréline ni obestatine. Ces souris ont été développées par le Dr. Tomasetto au sein de l'IGBMC et la caractérisation de leur phénotype n'avait pas encore été réalisée. Dans un premier temps nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation du phénotype de ces souris *ghrl*^{-/-}.

Des précédents modèles de souris *ghrl*^{-/-} ont été décrits dans la littérature. Ces souris ne présentent pas de phénotype particulier à l'âge adulte et dans des conditions nutritionnelles standards en ce qui concerne leur comportement alimentaire, leur poids ou leur taille (De Smet 2005, Sun et al 2003, Wortley et al 2004). Cependant aucune étude ne s'est encore intéressée à la caractérisation de la pulsatilité de la sécrétion de GH chez ces souris notamment à cause de la difficulté à effectuer des prélèvements de sang répétés chez ce petit animal. Dans un deuxième temps nous avons ainsi étudié la pulsatilité de la sécrétion de GH chez les souris *ghrl*^{-/-}, grâce à une technique de prélèvements répétés à la queue sur de petits volumes sanguins récemment développée, couplée à un dosage immunoenzymatique (EIA) très sensible et sélectif permettant de doser les concentrations en GH sur des petits volumes de sang total (Steyn et al 2011).

Enfin, des études ont montré des différences dans la sensibilité à l'environnement nutritionnel, et notamment une résistance à la prise de poids sous un régime riche en graisses, chez les souris *ghrl*^{-/-} lorsque ces souris étaient soumises à ce régime très tôt après le sevrage (Wortley et al 2005). Des observations du même type ont été retrouvées chez des

souris jeunes adultes déficientes pour le récepteur de la ghréline (*ghsr*^{-/-}) (Wortley et al 2005 , Zigman et al 2005) ainsi qu’au cours du vieillissement (Ma et al 2011) suggérant une implication plus de la ghréline dans la régulation du métabolisme énergétique au cours du développement post-natal et du vieillissement. Nous avons par conséquent étudié l’activité de l’axe somatotrope des souris *ghrl*^{-/-} à deux âges différents : chez des souris jeunes adultes âgées de 7 semaines et chez des souris âgées de 36 semaines.

GH peak amplitude is transiently blunted in young preproghrelin deficient mice.

Rim Hassouna¹, Philippe Zizzari¹, Catherine Tomasetto², Julie Cognet¹, Marion Pina¹, Jacques Epelbaum¹ and Virginie Tolle¹

¹UMR-S 894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France.

²UMR-7104 CNRS/U596 INSERM, Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), Université Louis Pasteur, Illkirch, France.

All correspondence and reprint requests should be addressed to:

Virginie Tolle

UMR894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences

2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Phone : +33 (0) 1 40 78 92 75

Fax : +33 (0) 1 45 80 72 93

e-mail : virginie.tolle@inserm.fr

Catherine Tomasetto

UMR-7104 CNRS/U596 INSERM

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)

Université Louis Pasteur, Illkirch, France

Phone : +33 (0) 3 88 65 35 19

Fax : +33 (0) 3 88 65 32 01

e-mail : cat@igbmc.fr

Key words: Ghrelin, GH secretion, GH Pulsatility, Knock-Out.

In preparation.

ABSTRACT

Ghrelin is a gut hormone originating from the post-translational cleavage of preproghrelin and is the endogenous ligand of the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHSR-1a). However, the role of the endogenous peptide in the regulation of pulsatile Growth Hormone (GH) secretion remains to be established. The main phenotypic change observed so far in preproghrelin knock-out (*ghrl* $-/-$) mice is a resistance to diet induced obesity when started shortly after weaning but not when started in older animals. The aim of this study was thus to compare the role of endogenous ghrelin in GH secretion at 7 and 36 weeks of age in *ghrl* $-/-$ mice. In order to assess GH pulsatile secretion, blood samples were collected by tail bleeding every 10 min over a period of 6 h in unaesthetized *ghrl* $-/-$ mice and wild type (WT) littermates. Cluster analysis showed a pulsatile GH secretory pattern in all genotypes at both ages. However GH peaks amplitude was significantly reduced in young *ghrl* $-/-$ mice compared to the WT littermates while at the age of 36 weeks difference no longer occurred between genotypes. These results suggest that ghrelin is a transient regulator of GH peak amplitude. The origin of the reduction in the GH pulsatile secretion in young *ghrl* $-/-$ mice remains to be determined.

INTRODUCTION

Ghrelin is a 28 amino acid peptide principally synthesized in the stomach and originally described as the endogenous ligand of the Growth Hormone Secretagogue 1a Receptor (GHS-R1a). Ghrelin is the only orexigenic gastrointestinal peptide and one of its main functions is to stimulate growth hormone (GH) secretion (Tschop et al 2000). Binding of ghrelin to the GHS-R1a, which relays most of ghrelin's biological effects, is made possible due to a post-translational acylation on its serine in position 3 (Gutierrez et al 2008, Yang et al 2008). In rats, treatment with a GHS-R1a antagonist at adult age modifies GH pulsatile secretion by reducing the amplitude of secretory peaks without affecting their frequency (Zizzari et al 2005), suggesting that acylated ghrelin is not involved in the generation of GH pulses but in their amplitude. However, in mice, the role of endogenous ghrelin in the regulation of pulsatile GH secretion still remains to be established.

Although the lack of clear phenotype in adult preproghrelin knockout mice (*ghrl*^{-/-}) under balanced nutrition initially suggested that endogenous ghrelin may not be important in the regulation of feeding or GH secretion, subsequent data have revealed that ghrelin may play a role in certain situations. Several studies showed phenotypic changes in preproghrelin knockout mice (*ghrl*^{-/-}) at specific ages while under standard conditions adult *ghrl*^{-/-} mice do not show any differences compared to their wild type (*ghrl*^{+/+}) littermates (Sun et al 2003), (Wortley et al 2004). More specifically, differences in the control of energy homeostasis and metabolism were observed during aging Ma (Ma et al 2011) or when mice were exposed to an environmental challenge, like a high fat diet, shortly after weaning or as young adults (Wortley et al 2005). We thus hypothesized that ghrelin could play a key role in the regulation of energy homeostasis and GH secretion during post-natal life and/or aging.

Therefore, the aim of this study was to establish and compare the role of endogenous ghrelin in the regulation of GH secretion in young adults (7 weeks old) and older (36 weeks old) *ghrl*^{-/-} and *ghrl*^{+/+} mice. In that purpose, we developed a new strain of *ghrl*^{-/-} mice and characterized the GH/IGF-1 axis thanks to a recently developed blood sampling technique coupled with a sensitive GH enzymatic immuno-assay (EIA) (Steyn et al 2011b).

MATERIALS AND METHODS

Ethic Statements

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the Animal Experimentation Committee of Paris Descartes University.

Animals

Experiments were conducted, during the light phase, in ghrl^{-/-} and ghrl^{+/+} male mice (except for ghrelin assay and GH pituitary contents where male and female were used) aged of 7 or 36 weeks. Mice were backcrossed on the C57BL/6 genetic background and were housed in a room under controlled illumination (7:00 AM to 7:00 PM) and temperature (22-24°C) and had free access to food and water. Offsprings were genotyped by PCR amplification of tail DNA. All animals were housed in a room under controlled illumination (7:00 AM to 7:00 PM) and temperature (22-24°C) and had free access to food and water. All experiments were started between 9:30 AM and 10:30 AM.

Weight and height measures

Mice were anesthetized with isoflurane and measured from nose to anus and then weighed.

Repeated blood samplings for GH assay

Mice were habituated to single housing before the beginning of the experiment and handled in order to minimize stress. 4µl of the whole venous blood was obtained from the tail vein every ten minutes (Steyn et al 2011a), and during 6h. Blood samples were collected in 116µl of the Enzyme ImmunoAssay (EIA) GH buffer (PBS-0.05% tween) and kept on ice until the end of experiment and then transferred to -20°C for storage before further analysis.

Hormone assays

Whole blood GH concentrations were evaluated by enzyme immunoassay (EIA) as previously described (Steyn et al 2011a). IGF-1 concentrations in plasma were evaluated by EIA (ALPCO 22-IG1MS-E01, USA). Acyl and des-acyl ghrelin were evaluated by specific EIA (SPIbio bertin pharma, A05118 for the acylated form and A05117 for the unacylated form, France).

RT-PCR analysis

Hypothalamus were dissected and mRNA extracted with Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA). cDNA were obtained from reverse transcription of 500ng total RNA. Expression of hypothalamic SRIH (Mm00436671-m1), GHRH (Mm00439098-m1) NPY (Mm00445771-m1), POMC (Mm00435874-m1), AgRP (Rn01431703-g1) and GHS-R 1a (Mm00616416-m1) were quantified using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems Inc., CA, USA) and 18S (Hs99999901-s1) was used as a housekeeping gene. Relative quantification (RQ) was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula where C_t is the threshold cycle of PCR at which amplified product was detected and $2^{-\Delta\Delta C_t}$ represents the fold change in gene expression normalized to 18S and relative to the WT group.

Statistical analysis

Values are given as mean \pm SEM, and statistical analysis were performed using ANOVA, repeated measure ANOVA followed by a Fisher *post-hoc* test when the p value of the ANOVA was significant ($p < 0.05$) using statview software (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). Areas Under the Curve (AUC) were calculated by the trapezoidal method.

ACKNOWLEDGMENTS:

We are grateful to Dr Parlow (NHPP, Los Angeles, USA) for the GH reagents. We are thankful to Alice Cougnon for animal care.

RESULTS

Generation and characterization of ghrl null mice

The mouse preproghrelin genomic DNA was isolated by screening of a 129/SvJ mouse genomic library with the preproghrelin cDNA. Genomic clones containing the ghrelin coding sequence were analyzed by restriction mapping. The targeting construct was designed to delete the leader sequence and the ghrelin coding sequence, encompassing exons 2 and 3 by Cre-loxP recombination. The SstI fragment of about 8 kb containing the whole gene was obtained by partial SstI digestion and inserted into a modified pBS vector. A unique Sall site was inserted upstream of exon 2 by site directed mutagenesis. This site was used to insert a LoxP site. The neomycine resistance gene cassette flanked by two LoxP sites was inserted into a unique KpnI site present downstream of exon 3. After electroporation with the linearized targeting construct, two hundred and thirty six G418-resistant embryonic stem (ES) cell clones were selected. Targeting of the ghrelin locus was determined by Southern blot hybridization with 5' and 3' genomic probes present outside of the construct (Figure 1A-B). Hind III digestion of genomic DNA generated a WT fragment of 4 kb and a targeted allele (L3) fragment of 6 kb. A single insertion of the construct was confirmed by hybridization of a probe specific for the neomycin-resistance gene. Sixteen targeted ES cell clones were obtained and karyotype analysis was performed on clones #72 and 76. The deleted and floxed ghrelin alleles were obtained by transient transfection of the Cre recombinase in the targeted ES cell line #76. Among the 78 G418- sensitive clones obtained, clones #9 and 6 had a deleted (-) and floxed (L2) alleles, respectively (Figure 1A-B). Ghrelin +/- and +/-L2 ES cells were injected into C57BL6/J blastocysts to generate chimeric mice. The resulting male chimeras were backcrossed with C57BL6/J females, and germ-line transmission in F1 ghrelin +/- and L2 mice was verified by PCR analysis (Figure 1C).

Quantity and concentration of acylated (AG) and des-acylated (DAG) ghrelin in stomach and plasma respectively were evaluated in ghrl -/- and ghrl +/+ mice. The ghrl -/- mice do not synthesize neither AG nor DAG (Figure 2). Acylated ghrelin receptor, GHS-R1a, expression was measured by RT-PCR and was identical in both genotypes (data not shown).

GH pulsatility in ghrl -/-, ghrl +/- and ghrl +/+ in 7 and 36 weeks old mice

In 7 weeks ghrl -/- mice, a decrease in GH secretion is observed compared to ghrl +/+ mice (Figure 3A) with a reduction of the area under the GH secretion curve (AUC) due to a decrease in peaks amplitude in ghrl -/- mice when compared to ghrl +/- and ghrl +/+ mice (Figure 4A and D). At 36 weeks old, the GH secretory profile of ghrl -/- mice is restored

(Figure 3B) and differences between ghrl $-/-$ and ghrl $+/+$ mice are no longer observed (Figure 4).

Weight, height and IGF-1 measures in ghrl $-/-$, ghrl $+/-$ and ghrl $+/+$ in 7 and 36 weeks old mice

Length and weight between ghrl $-/-$ and ghrl $+/+$ mice are similar at both ages. Although a tendency to a decreased IGF-1 concentration in 7 weeks ghrl $-/-$ mice is observed compared to ghrl $+/+$ littermates, it does not reach significance (Table 1). IGF-1 concentrations are decreased with aging while length and weight are increased.

GH pituitary contents in ghrl $-/-$, ghrl $+/-$ and ghrl $+/+$ in 7 and 36 weeks old mice

Although no difference in GH pituitary contents is observed between mice of the different genotypes at both ages, a significant decrease of GH quantity occurs with aging (Table 1).

Expression of hypothalamic neuropeptide involved in the regulation of GH secretion and food intake in ghrl $-/-$, ghrl $+/-$ and ghrl $+/+$ in 7 weeks old mice

GHRH expression is increased in 7 weeks old ghrl $-/-$ mice compared to ghrl $+/+$ mice (Figure 5). A significant difference in the expression of the other hypothalamic neuropeptides is not observed between the different genotypes. However, a factor analysis revealed a change in the expression of neuropeptides involved in the regulation of GH secretion (GHRH, SRIH and NPY) between 7 weeks old ghrl $-/-$ and ghrl $+/+$ mice while no difference was observed concerning the peptides involved in the melanocortin system (POMC and AgRP) (Figure 6).

DISCUSSION

The present study indicates that endogenous ghrelin is involved in the regulation of GH secretion during development and in early adulthood. Indeed, GH secretion is reduced in 7 weeks ghrl^{-/-} mice while this secretion is restored in older mice (36 weeks). It is the first time to our knowledge that secretory profiles in ghrl^{-/-} mice are measured. This diminution in GH secretion in young ghrl^{-/-} mice seems to have no impact on body growth: length and weight are identical to ghrl^{+/+} mice as IGF-1 plasmatic concentrations. These observations confirm the results obtained by other groups working in different models of ghrl^{-/-} mice (Sun et al 2003), (Wortley et al 2004) (De Smet 2005). However when ghrl^{-/-} mice were subjected to a high fat diet shortly after weaning they develop a resistance to obesity induced by this kind of diet (Wortley et al 2005) suggesting a critical role for ghrelin in regulation of energy homeostasis during post-natal life. Thus ghrelin may be a transient regulator of energy homeostasis and GH secretion during post-natal life.

Administration of a GHS-R 1a antagonist leads to a reduction in GH peak amplitude without modifications in the frequency (Zizzari et al 2005). This is concordant with the diminution of peaks height in 7 weeks old ghrl^{-/-} mice and confirms that ghrelin regulate GH peaks amplitude rather than its pulsatile pattern. Surprisingly, this altered GH secretion is not associated with significant differences in the body length. Although a diminution of GH secretion is observed in 7 weeks ghrl^{-/-} mice, the pulsatile rhythm is intact and may be sufficient to maintain growth. Indeed, repeated GH administrations are more efficient to induce growth and IGF-1 secretion than the same quantity of GH injected as a bolus (Clark and Robinson 1985) (Isgaard et al 1988) (Maiter et al 1988). Thus, despite the reduction in GH peak amplitude, growth is not changed compared to ghrl^{+/+}. The activity of ghrelin to stimulate GH secretion is dependent on the presence of an eight-carbon fatty acid residue attached to Ser in position 3. Mice deficient for GOAT, the enzyme that acylates ghrelin, have undetectable circulating levels of acylated ghrelin but increased desacyl ghrelin. Although growth retardation or changes in body composition have been reported in this model, they have reduced GH secretion and are unable to maintain normal blood glucose during severe caloric restriction (Zhao et al 2010a). Thus acylated ghrelin, although not critical for normal growth, may be necessary to maintain GH levels for adapting metabolism to the body's nutritional needs.

But we cannot exclude an impact earlier during development or on other parameters regulated by GH like lipid metabolism and energy homeostasis (Casanueva 1992) (Moller et al 1990) (Horber and Haymond 1990).

The reduction in GH secretion does not seem to be the consequence of reduced GH pituitary contents as at both ages, there were no difference between genotypes. However, as expected, in all genotypes mice are taller and heavier when aging and IGF-1 concentrations and pituitary GH contents are increased (Sonntag et al 1980).

Among all neuropeptides expression that we tested by real-time RT-PCR, only GHRH is increased in 7 weeks ghrl^{-/-} mice. This may be the result of a compensatory mechanism that takes place in order to stimulate GH secretion in the absence of endogenous ghrelin. A previous study had already explored the hypothalamic expression of the same neuropeptides in ghrl^{-/-} mice and had not seen any difference with ghrl^{+/+} mice but this was in older mice (De Smet 2005). Furthermore, the factor analysis shows a change in the peptides involved in the GH secretion of 7 weeks old ghrl^{-/-} mice, which is concordant with the difference in GH secretion that we observe between ghrl^{-/-}, and ghrl^{+/+} mice at this age. Expression of the same neuropeptides at 36 weeks would be interesting to analyse if the difference between genotypes is corrected.

Moreover, we cannot exclude that a defect of hypothalamic GHRH release occurs in ghrl^{-/-} mice nor a defect of GH release at the pituitary level. The expression of GHRH-R at the pituitary level could also be affected and will be interesting to be compared in the two genotypes.

In conclusion, endogenous ghrelin does modulate GH pulse amplitude in young mice suggesting that ghrelin is important for regulating pulsatile GH secretion during post-natal life. It can be interpreted as a mechanism to rapidly adapt to changes in the environment when animal are still growing.

REFERENCES

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. pp. 656-660.
2. Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefèbvre O, et al. (2000) Identification and Characterization of a Novel Gastric Peptide Hormone: The Motilin-Related Peptide. *Gastroenterology*. pp. 395-405.
3. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, EPELBAUM J, et al. (2001) In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. pp. 54-61.
4. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. pp. 908-913.
5. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, et al. (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. pp. 6320-6325.
6. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*. pp. 387-396.
7. Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, et al. (2005) Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology*. pp. 3836-3842.
8. Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003) Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology*. pp. 7973-7981.
9. Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, et al. (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp. 8227-8232.
10. Ma X, Lin L, Qin G, Lu X, Fiorotto M, et al. (2011) Ablations of Ghrelin and Ghrelin Receptor Exhibit Differential Metabolic Phenotypes and Thermogenic Capacity during Aging. *PLoS ONE*. pp. e16391.
11. Wortley KE, del Rincon J-P, Murray JD, Garcia K, Iida K, et al. (2005) Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest*. pp. 3573-3578.
12. Steyn FJ, Huang L, Ngo ST, Leong JW, Tan HY, et al. (2011) Development of a Method for the Determination of Pulsatile Growth Hormone Secretion in Mice. *Endocrinology*. pp. 3165-3171.
13. Steyn FJ, Huang L, Ngo ST, Leong JW, Tan HY, et al. (2011) Development of a method for the determination of pulsatile growth hormone secretion in mice. *Endocrinology* 152: 3165-3171.
14. De Smet B (2005) Energy Homeostasis and Gastric Emptying in Ghrelin Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. pp. 431-439.
15. Clark RG, Robinson IC (1985) Growth hormone responses to multiple injections of a fragment of human growth hormone-releasing factor in conscious male and female rats. *J Endocrinol*. pp. 281-289.
16. Isgaard J, Carlsson L, Isaksson OG, Jansson JO (1988) Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology*. pp. 2605-2610.
17. Maiter D, Underwood LE, Maes M, Davenport ML, Ketelslegers JM (1988) Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. pp. 1053-1059.
18. Zhao T-J, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, et al. (2010) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp. 7467-7472.

19. Casanueva FF (1992) Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* pp. 483-517.
20. Moller N, Jorgensen JO, Alberti KG, Flyvbjerg A, Schmitz O (1990) Short-term effects of growth hormone on fuel oxidation and regional substrate metabolism in normal man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp. 1179-1186.
21. Horber FF, Haymond MW (1990) Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. *J Clin Invest.* pp. 265-272.
22. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980) Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology.* pp. 1875-1879.

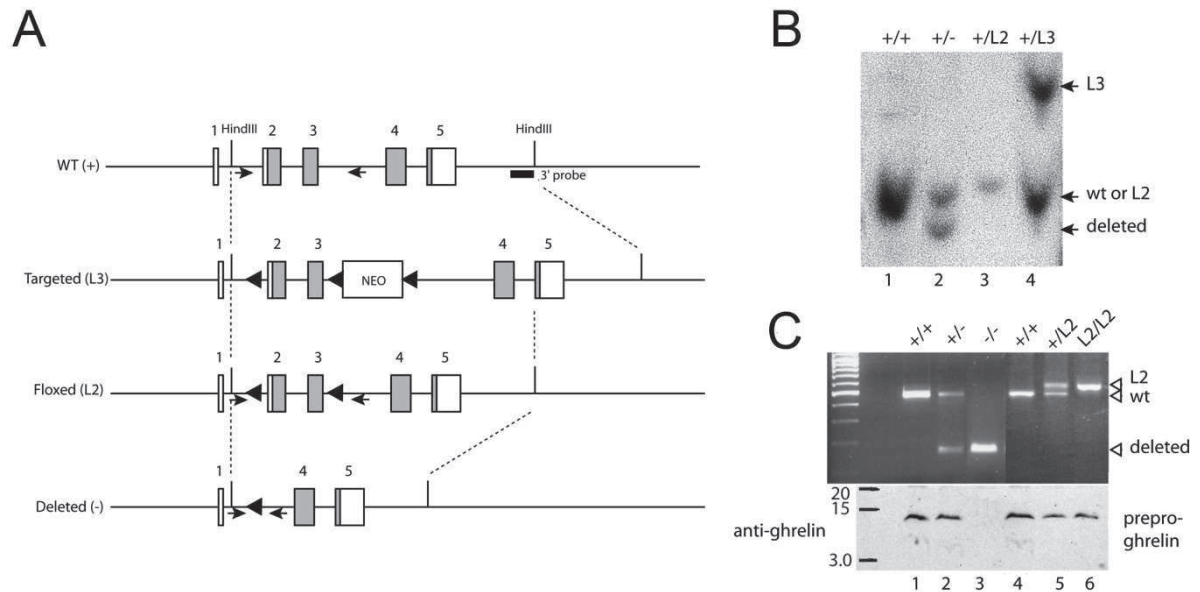


Figure 1: Generation of ghrelin knockout mice.

Schematic representations of the mouse wild-type preproghrelin gene (WT), targeted allele (L3), floxed allele (L2) and deleted allele induced by Cre recombinase (-). The ghrelin gene includes 5 exons shown as boxes, the leader and ghrelin peptides are encoded by exons 2 and 3. Translated and un-translated regions of exons are shown as white and gray boxes, respectively. The position of the 3'-probe used for Southern blotting and the primers (arrows) used for PCR screening are shown. (B) Genotyping of +/+, +/+, +/L2 and +/L3 ES cell lines. Southern blot analysis was performed on HindIII-digested DNA with the radiolabeled 3'-probe. Arrows indicate the 4 kb wild-type or L2, the 6 kb L3 and the 3.5kb deleted fragments. (C) Genotyping and Western blot analysis for ghrelin expression. In the upper panel, genotyping was carried out by using PCR analysis of mouse tail DNA. WT, L2 and deleted DNA fragments are indicated by open arrows heads. The lower panel shows Western blot analysis of ghrelin protein expression. Total protein extracts (40 µg) from corresponding mice stomachs were analyzed by using polyclonal anti-ghrelin antibody. Note that ghrelin expression is lost in deleted mice and unchanged in floxed mice.

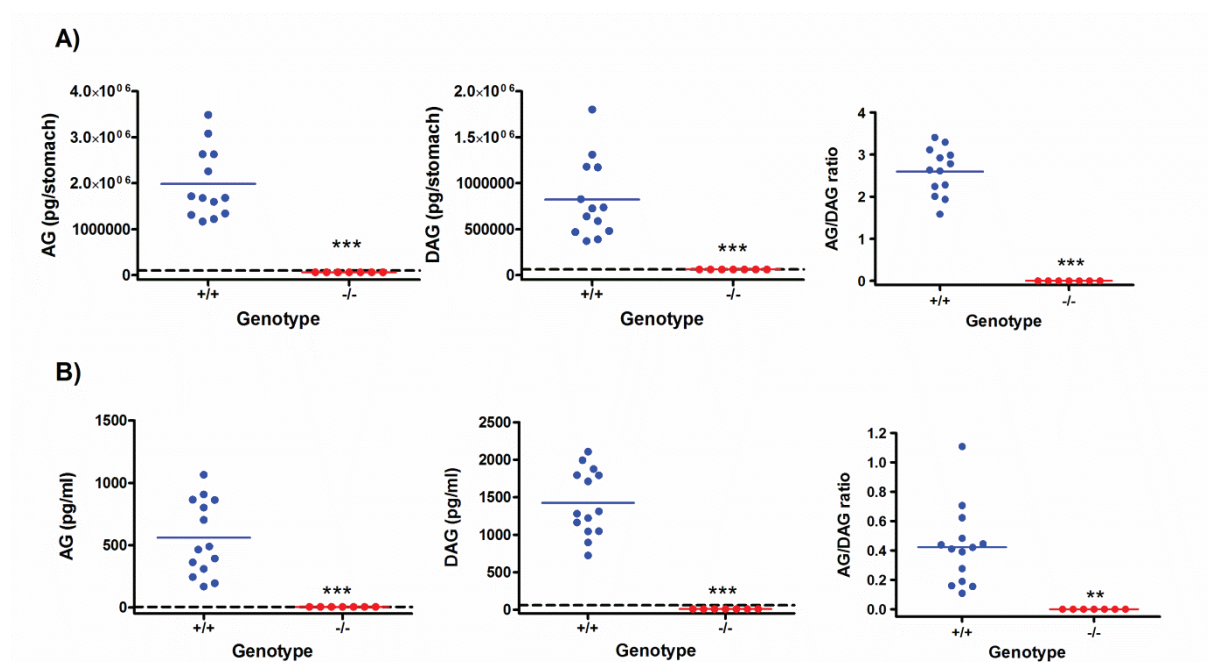
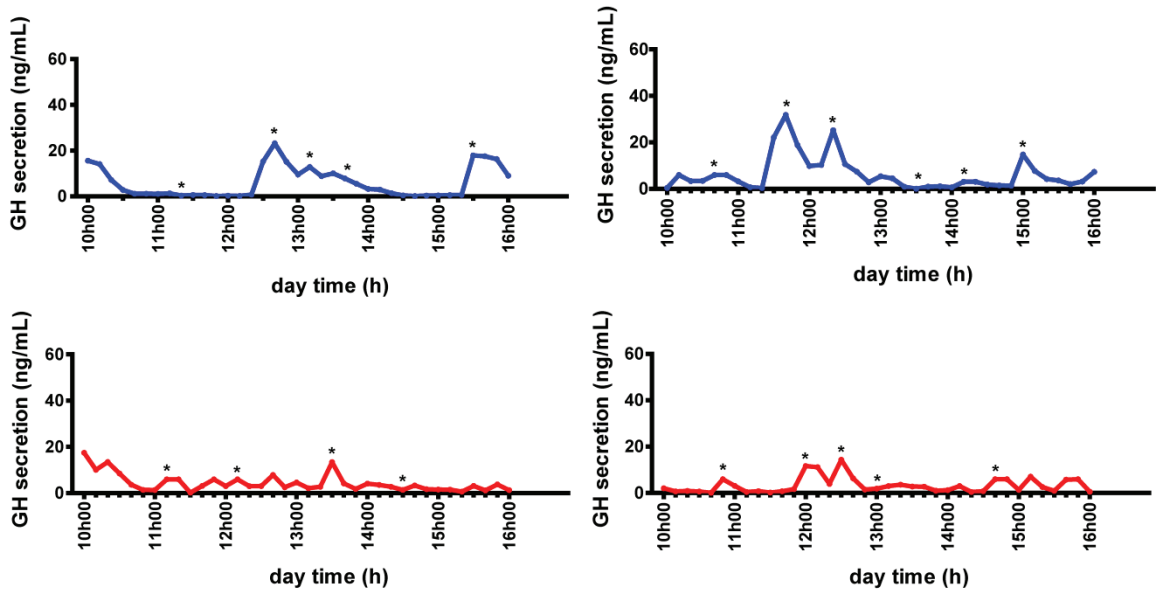


Figure 2: Stomach content (A) and plasma concentrations (B) of acyl-ghrelin (AG), desacyl-ghrelin (DAG) and AG/DAG ratio in ghrl+/+ and -/- mice. *: $p < 0,001$ vs ghrl+/+, ##: $p < 0,01$ and ### : $p < 0,001$ vs ghrl+/-**

A



B

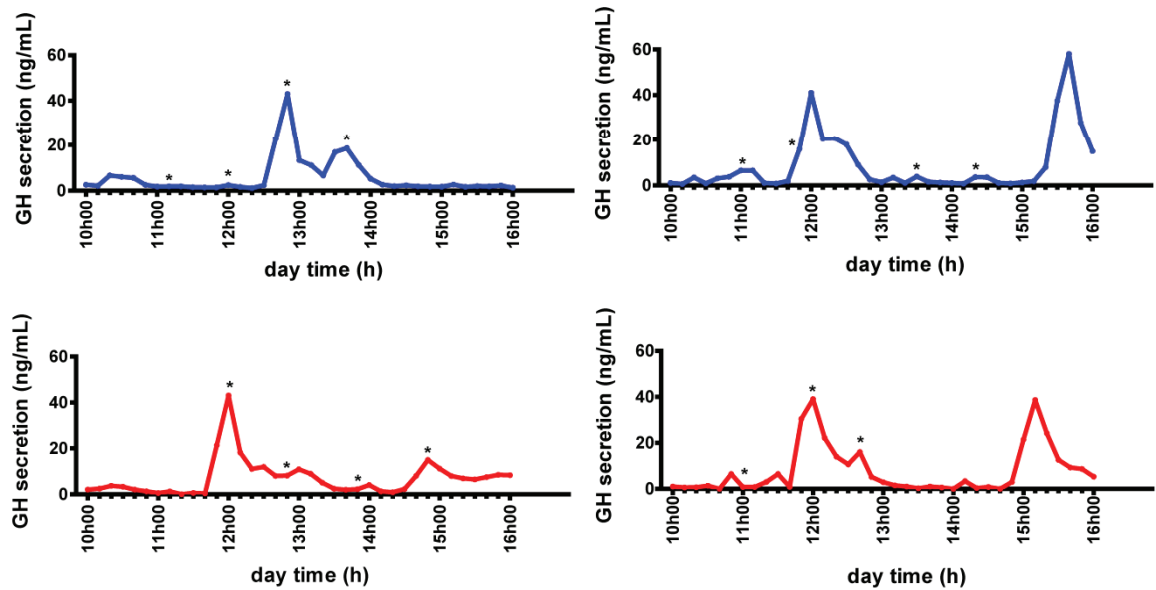


FIGURE 3: Representative individual secretory profiles in 7 and 36 weeks old *ghrl*^{-/-} and *ghrl*^{+/+} mice.

Individual 6h GH secretion profiles in 7 weeks old *ghrl*^{+/+} (blue) and *ghrl*^{-/-} (red) mice. (A) Individual 6h GH secretion profiles of 36 old *ghrl*^{+/+} (blue) and *ghrl*^{-/-} (red) mice. (B) * represents peaks of secretion determined by Cluster 8.

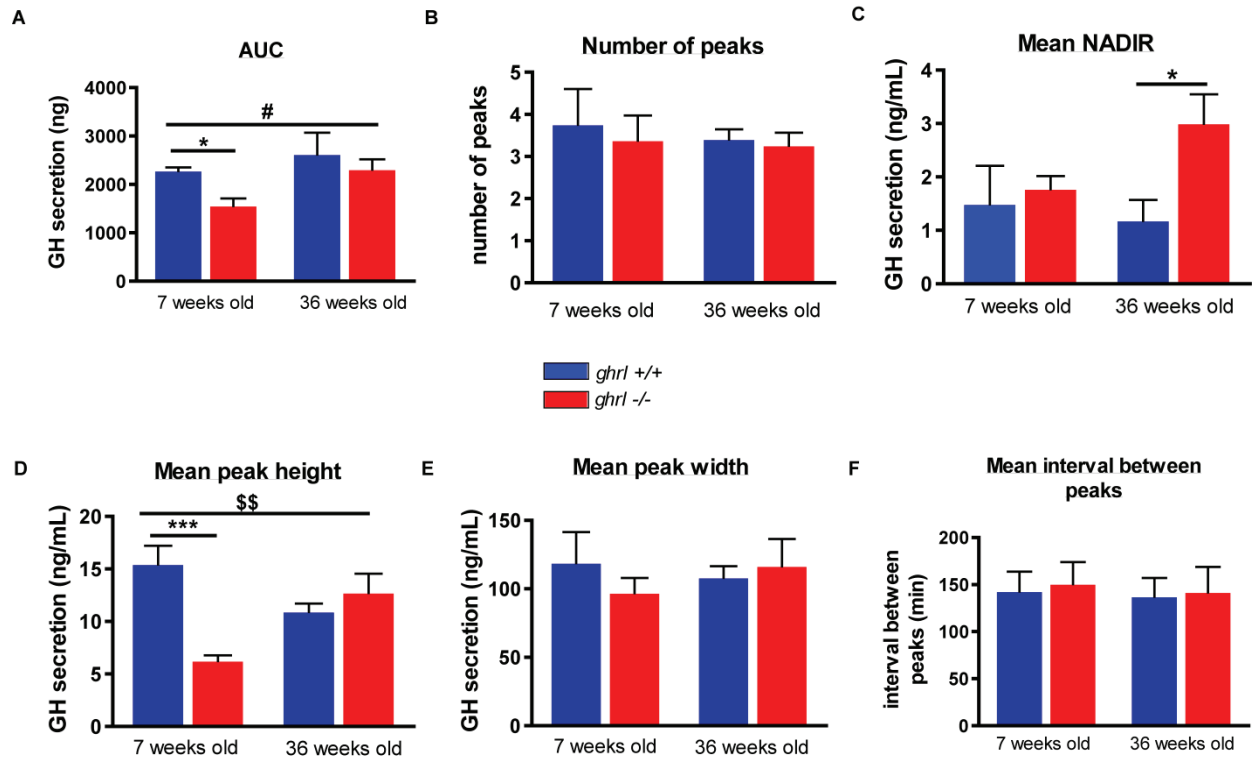


Figure 4: Analysis of pulsatility parameters in 7 and 36 week-old ghrl+/+ and ghrl-/- mice. Area Under the secretion curve (A), number of peaks (B), mean NADIR (C), peak height (D), peak width (E) and interval between peaks (F) in ghrl+/+ and ghrl-/- mice of 7 and 36 week-old. Data represent mean \pm SEM. * : $p < 0,05$ ghrl+/+ vs ghrl-/-, *** : $p < 0,001$ ghrl+/+ vs ghrl-/-, # : $p < 0,05$ 7 weeks vs 36 weeks, \$\$: $p < 0,01$ interaction between age and genotype. 7 weeks old ghrl+/+: n=4, 36 weeks old ghrl+/+: n=5, 7 weeks old ghrl-/-: n=8, 36 weeks old ghrl-/-: n=8.

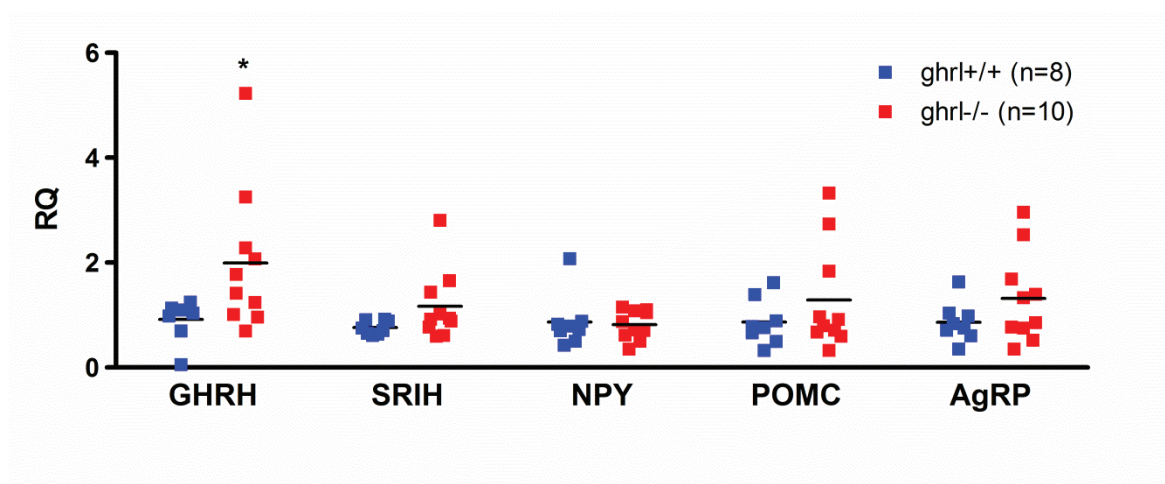


Figure 5: Expression of hypothalamic ARC neuropeptides involved in the regulation of food intake and GH secretion in 7 weeks old ghrl+/+ and ghrl-/- mice.

* : $p < 0,05$ vs ghrl+/+

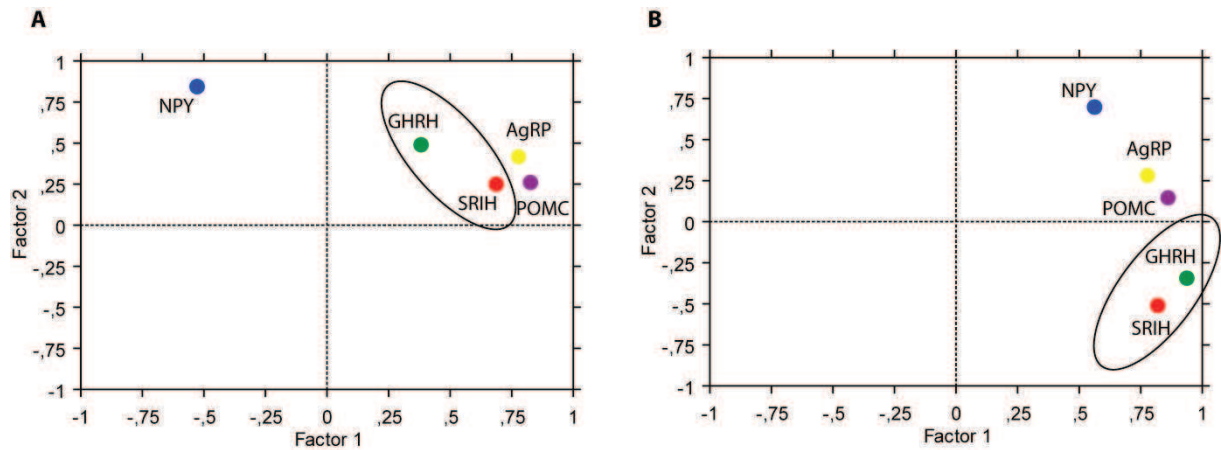


Figure 6 : Factor Analysis of the expression of the hypothalamic ARC neuropeptides involved in regulation of food intake and GH secretion in 7 weeks old ghrl+/+ and ghrl-/- mice.

The expression of neuropeptides involved in GH secretion, GHRH, SRIH and NPY are different in 7 weeks old ghrl+/+ (A) and ghrl-/- (B) mice, whereas the melanocortine system (i.e. AgRP and POMC) is identical in both genotypes. Factor 1 and 2 represents feeding and GH respectively.

	Genotype	Weight (g)	Length (cm)	IGF-1 (ng/ml)	GH content ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protein)
7 weeks old	+/+	22,2 \pm 0,6 (n=12)	9,33 \pm 0,08 (n=12)	526 \pm 49 (n=13)	0,40 \pm 0,08 (n=13)
	-/-	21,9 \pm 0,6 (n=15)	9,25 \pm 0,08 (n=15)	448 \pm 34 (n=14)	0,29 \pm 0,03 (n=12)
36 weeks old	+/+	33,9 \pm 0,5 (n=6)	10,32 \pm 0,11 (n=6)	353 \pm 37 (n=18)	0,23 \pm 0,02 (n=12)
	-/-	34,6 \pm 1,1 (n=7)	10,19 \pm 0,09 (n=7)	399 \pm 44 (n=13)	0,28 \pm 0,05 (n=7)

Table 1: Weight, naso-anal length, plasma IGF-1 and pituitary GH content in 7 and 36 weeks old preproghrelin +/+ and -/- mice.

There is a significant effect of age on body weight ($P < 0,0001$), body length ($P < 0,0001$) and plasma IGF-1 ($P = 0,01$).

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Parallèlement à l'exploration de la pulsatilité de GH chez les souris *ghrl*^{-/-}, nous avons également commencé à caractériser cette pulsatilité chez les souris *ghrl*^{+/-} n'ayant qu'une seule copie du gène pour déterminer si le phénotype observé pouvait être dose-dépendant. Nous anticipions que la perte d'un allèle pouvait modifier les quantités de ghréline produites et par conséquent avoir également un impact sur la pulsatilité de GH.

Les quantités de ghréline acylée (AG) et non acylée (DAG) de l'estomac et les concentrations plasmatiques de ces mêmes peptides ont été mesurées par dosages immunoenzymatiques spécifiques de chacune des formes (SPIbio bertin pharma, A05118 pour la forme acylée et A05117 pour la forme non acylée, France) chez les souris *ghrl*^{+/-} (Figure 17).

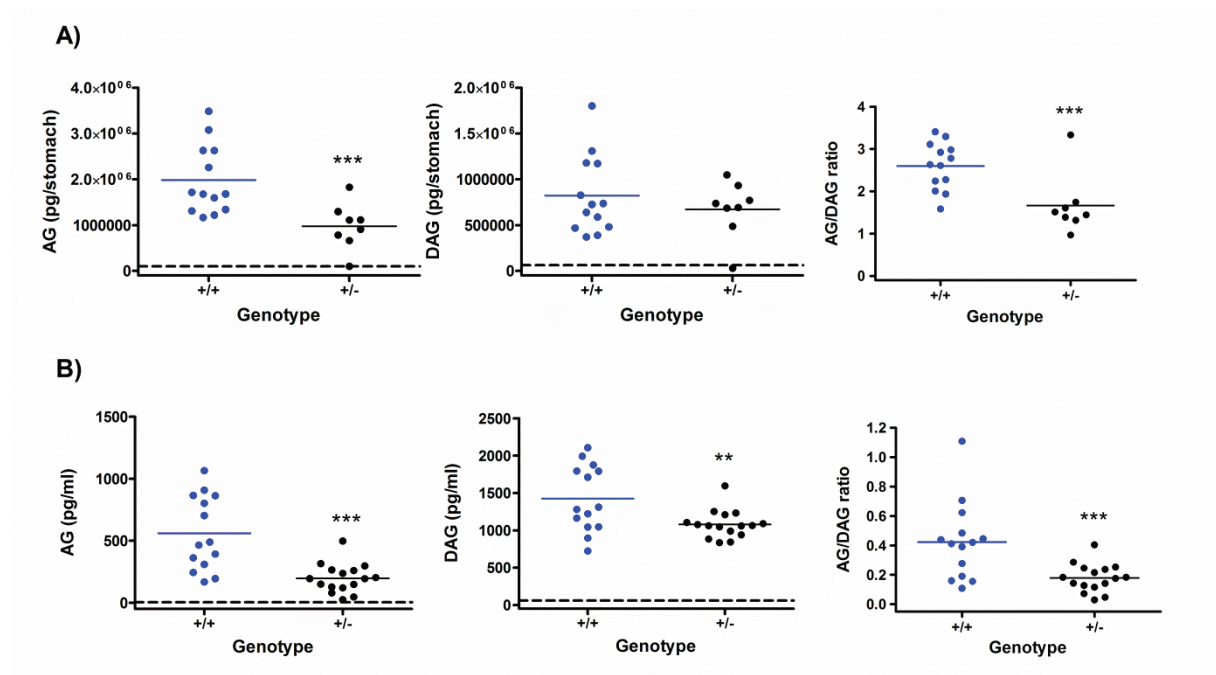


Figure 17: Contenus de l'estomac (A) et concentrations plasmatiques (B) de ghréline acylée (AG), ghréline non acylée (DAG) et ratio AG/DAG chez les souris *ghrl*^{+/+} et *ghrl*^{+/-}. **: p<0,01 vs *ghrl*^{+/+}, *: p<0,001 vs *ghrl*^{+/+}. Les souris sont âgées de plus de 36 semaines.**

Les ratios de AG/DAG dans l'estomac et le plasma sont environ divisés par deux chez les souris *ghrl+/-* lorsqu'elles sont comparées aux souris sauvages (*ghrl+/+*). Cette diminution du ratio AG/DAG est principalement due à la baisse de la quantité dans l'estomac ou de la concentration plasmatique de ghréline acylée chez les souris *ghrl+/-*.

Le profil pulsatile de la sécrétion de GH a ensuite été exploré chez ces souris *ghrl+/-* qui présentent environ deux fois moins de ghréline acylée dans la circulation. La sécrétion pulsatile de GH a été mesurée sur 6h chez des souris mâles *ghrl+/-* et *ghrl+/+* âgées de 7 et 36 semaines (Figure 18). Les paramètres de pulsatilité ont ensuite été analysés par la méthode Cluster (Figure 19).

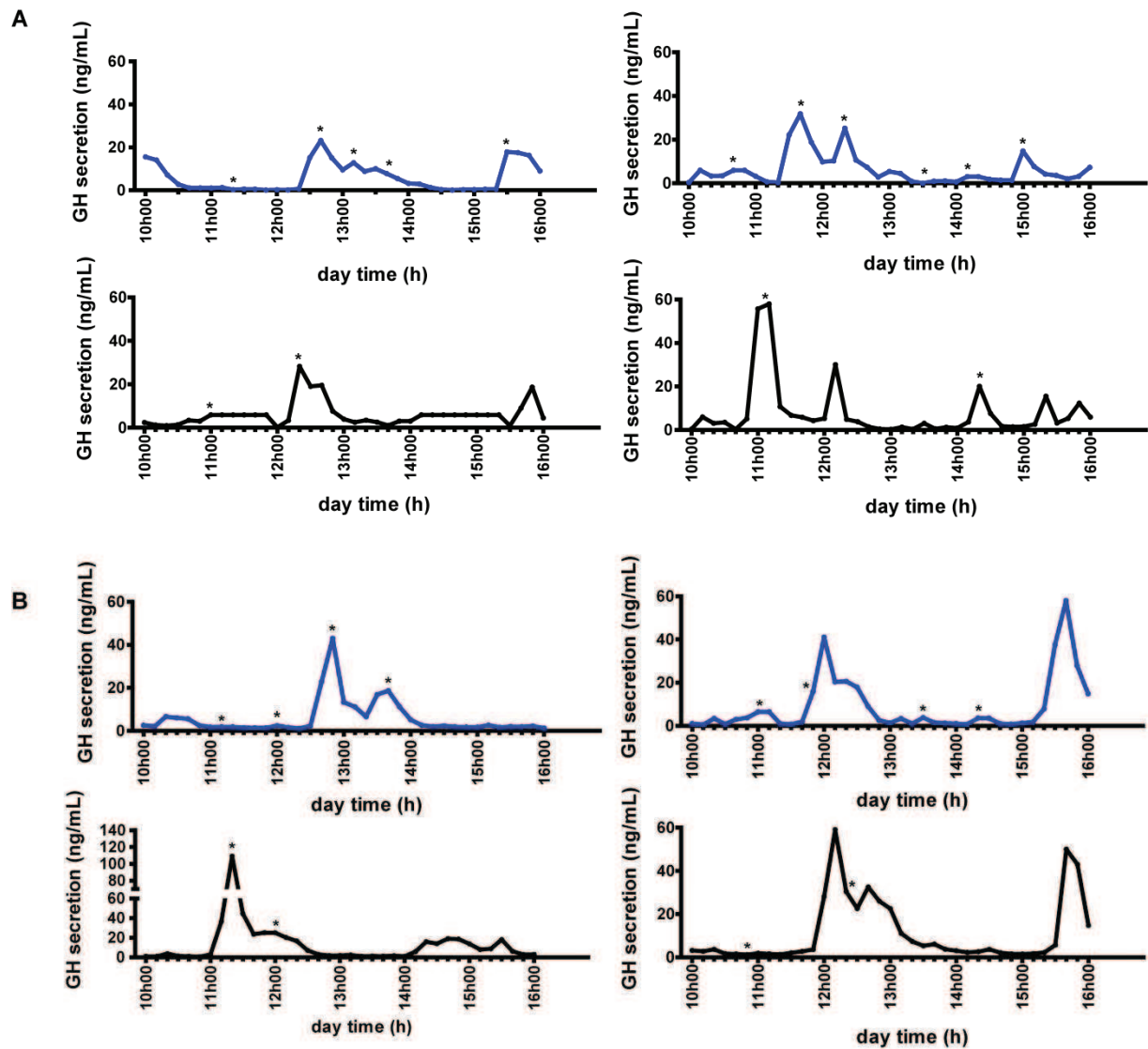


FIGURE 18: Profils de sécrétion de GH représentatifs chez les souris *ghrl*^{+/+} et *ghrl*^{+/-} âgées de 7 and 36 semaines.

Profils individuels de sécrétion de GH sur 6h chez les souris *ghrl*^{+/+} (bleu) and *ghrl*^{+/-} (noir) âgées de 7 semaines (A). Profils individuels de sécrétion de GH sur 6h chez les souris *ghrl*^{+/+} (bleu) and *ghrl*^{+/-} (noir) âgées de 36 semaines (B). * représente les pics de secretion détectés par le logiciel Cluster 8.

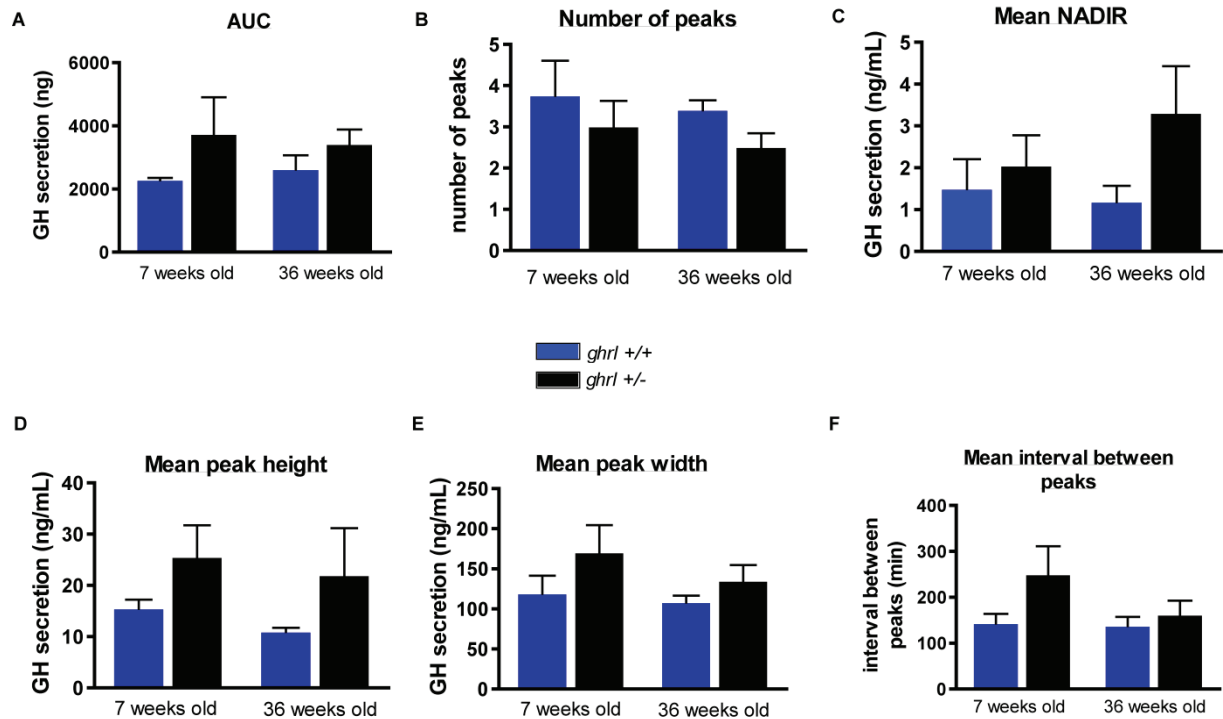


Figure 19: Analyse Cluster des paramètres de pulsatilité chez les souris *ghrl*^{+/-} et *ghrl*^{+/+} âgées de 7 et 36 semaines.

Aire sous la courbe de secretion (AUC) (A), nombre de pics (B), NADIR moyens (C), hauteur des pics (D), largeur des pics (E) and intervals entre les pics (F) chez les souris *ghrl*^{+/+} and *ghrl*^{+/-} âgées de 7 et 36 semaines. Les données sont représentées en moyennes ± SEM. 7 semaines *ghrl*^{+/+}: n=4, 36 semaines *ghrl*^{+/+}: n=5, 7 semaines *ghrl*^{+/-}: n=6, 36 semaines *ghrl*^{+/-}: n=6.

Malgré une concentration plasmatique en ghréline acylée divisée par deux, aucune différence dans les profils de sécrétion pulsatile de GH n'est observée entre les souris *ghrl*^{+/-} et *+/+* que ce soit à 7 ou 36 semaines. Ce résultat est confirmé par l'analyse Cluster des paramètres de pulsatilité.

Ghréline et obestatine sont toutes deux issues du clivage protéolytique du même précurseur : la préproghréline. Afin de vérifier que notre modèle de souris *ghrl*^{-/-} ne synthétise ni ghréline ni obestatine nous avons également mesuré la quantité d'obestatine plasmatique et au niveau de l'estomac par dosage radio-immunologique (RIA ultrasensible kit, RKU-031-90, Phoenix Pharmaceuticals) (Figure 20).

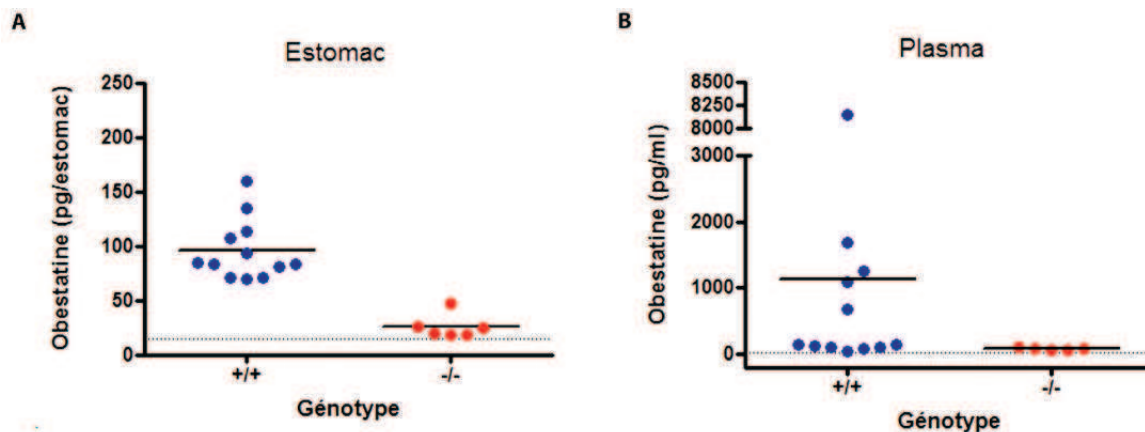


Figure 20 : Quantité au niveau de l'estomac (A) et concentration plasmatique (B) en obestatine

La ligne pointillée représente le seuil de détection du dosage, 15pg au niveau de l'estomac et 20pg/ml au niveau plasmatique.

Au niveau de l'estomac, les quantités d'obestatine chez les souris *ghrl*^{-/-} sont à la limite du seuil de détection alors que le même dosage ne permet pas de détecter d'obestatine dans le plasma confirmant que ces souris ne produisent et ne sécrètent aucun des peptides dérivés de la préproghréline.

La prise alimentaire a été mesurée en condition basale chez les souris *ghrl*^{-/-} pour déterminer l'impact de la délétion du gène de la préproghréline sur la prise alimentaire et l'activité (Figure 21). Cette étude a été effectuée chez des souris mâles *ghrl*^{-/-} et *+/+* âgées de 12 semaines dans un système de cage dans lesquelles la mesure de la prise alimentaire et de l'activité est automatisée (TSE systems, GmbH, Allemagne).

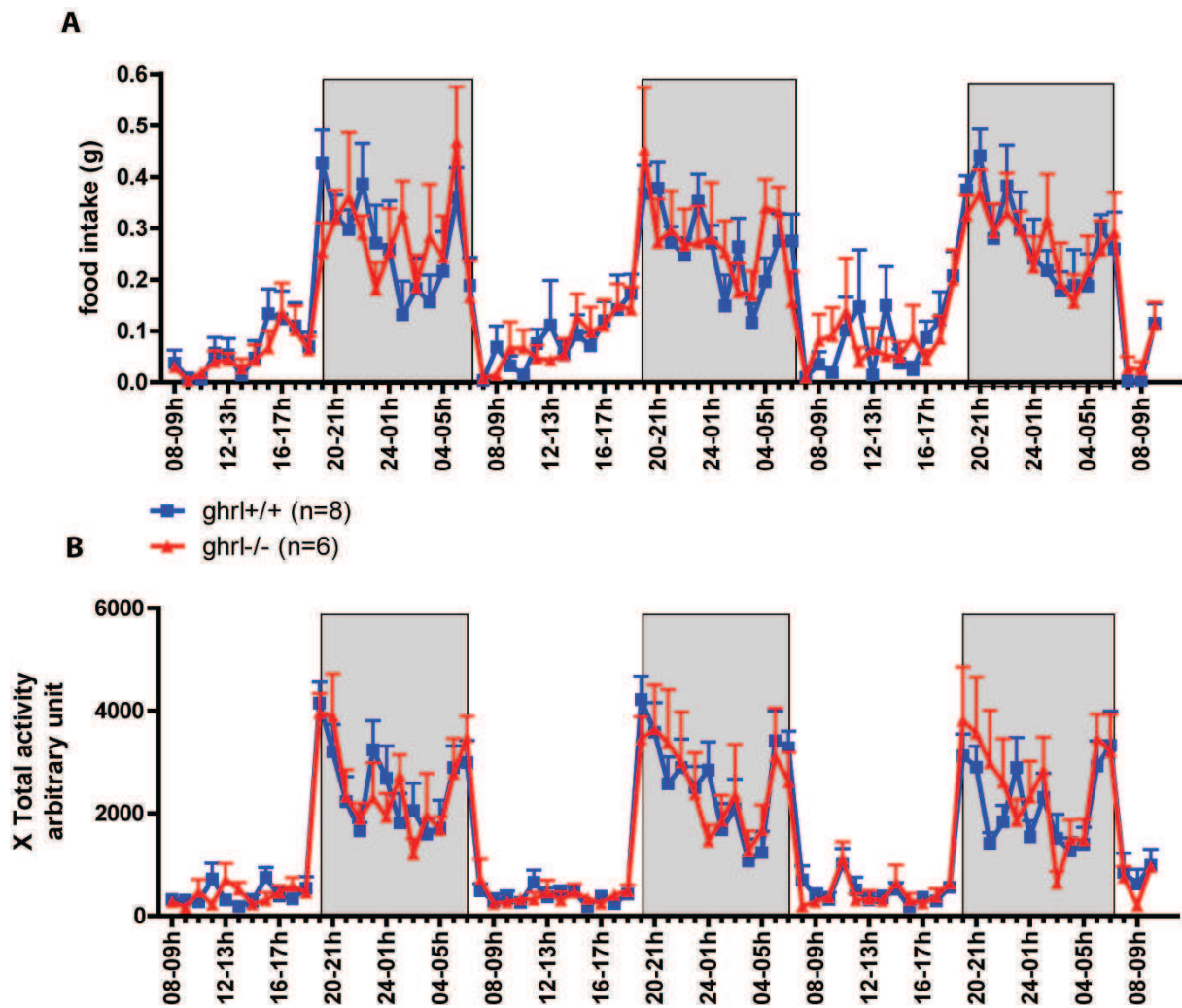


Figure 21 : Prise alimentaire et activité spontanée chez les souris ghrl+/+ et ghrl-/- âgées de 12 semaines.

Prise alimentaire spontanée par tranches horaires d'une heure chez les souris ghrl+/+ et -/- mâles (A) Activité spontanée par tranches horaires d'une heure chez les souris ghrl+/+ et -/- mâles (B).

La prise alimentaire et l'activité spontanées ne sont pas modifiées chez les souris ghrl-/- comparées aux souris ghrl+/+. Le comportement alimentaire des souris ghrl+/- est en cours d'étude.

RESULTATS NOTABLES

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé un nouveau modèle de souris *ghrl*^{-/-}. Ces souris *ghrl*^{-/-} ne produisent ni ghréline ni obestatine permettant ainsi l'étude du rôle de la préproghréline endogène. Comme pour les modèles précédemment décrits, ces souris *ghrl*^{-/-} ne présentent pas de différences staturo-pondérales ou dans leur comportement alimentaire comparées aux souris sauvages.

Les souris *ghrl*^{-/-} tout comme les souris sauvages présentent une sécrétion pulsatile de GH caractéristique aux différents âges observés avec des valeurs basales de GH basses séparées par des pics de sécrétion d'amplitude plus élevée environ toutes les 3 heures. Néanmoins l'amplitude des pics sécrétoires de GH est diminuée chez les souris jeunes adultes *ghrl*^{-/-} de 7 semaines comparées aux souris sauvages du même âge. Cette diminution de la sécrétion de GH observée chez les souris *ghrl*^{-/-} âgées de 7 semaines est transitoire et l'amplitude des pics est restaurée chez les souris âgées de 36 semaines. De plus cette diminution de la sécrétion de GH n'est pas accompagnée d'un retard de croissance ou d'une baisse des taux d'IGF-1 bien que pour ce dernier paramètre une tendance soit observée. La régulation de l'homéostasie énergétique de ces jeunes souris *ghrl*^{-/-} n'a pas été explorée mais pourrait également être impactée par la diminution de GH.

Parmi les neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la sécrétion de GH, seule la GHRH est impactée. En effet, l'expression hypothalamique de GHRH est augmentée chez les souris *ghrl*^{-/-} âgées de 7 semaines suggérant un mécanisme de compensation. Parallèlement, les contenus hypophysaires en GH de ces mêmes souris sont identiques à ceux des souris sauvages que ce soit à 7 ou 36 semaines. D'après ces deux derniers résultats, chez les souris *ghrl*^{-/-} âgées de 7 semaines des défauts de la libération hypothalamique de GHRH ou hypophysaire de GH ne sont pas à exclure.

Les résultats de cette étude confirment que la ghréline possède un rôle important au cours du développement post-natal et notamment pour la régulation de la sécrétion de GH, dont les mécanismes restent à identifier.

**Partie III : Manipulations pharmacologiques pour l'étude de la signalisation
ghréline/GHSR**

Situation du sujet et objectif de l'étude

La ghréline a été isolée à partir de l'estomac en tant que ligand endogène des GH sécrétagogues (GHS-R1a) en 1999 (Kojima et al 1999) alors que le clonage du GHS-R1a, un récepteur jusque là orphelin, avait déjà eu lieu il y a quelques années à partir d'hypophyses de porc (Howard et al 1996). Cette découverte est intervenue alors que dès les années 80 plusieurs composés ont été développés afin de stimuler la sécrétion de GH, les GH sécrétagogues (Bluet-Pajot et al 2001).

Seule la ghréline acylée se fixe au GHS-R1a et stimule la sécrétion de GH et la prise alimentaire (Gutierrez et al 2008, Yang et al 2008). Alors que l'action de plusieurs antagonistes du GHS-R1a sur l'action de la ghréline exogène sur la sécrétion de GH et/ou la prise alimentaire a été décrite, certains résultats suggèrent que les voies par lesquelles la ghréline stimule la sécrétion de GH et la prise alimentaire soient différentes. Ainsi, le [D-Lys3]-GHRP6 exerce un effet antagoniste sur la prise alimentaire alors que la sécrétion pulsatile de GH n'est pas affectée (Asakawa et al 2003, Okimura et al 2003). Ces peptides semblent donc intéressants pour l'étude des voies de signalisation ghréline/GHS-R notamment afin de cibler des actions spécifiques de la ghréline sans affecter les autres. Cependant les cibles neuronales et les mécanismes cellulaires impliqués dans la signalisation liée à ces peptides sont mal connues.

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à un antagoniste spécifique du GHS-R1a, le BIM28163 ainsi qu'à un agoniste le BIM28131. L'infusion chronique de ce peptide abouti à une diminution de l'amplitude des pics sécrétoires de GH sans affecter la prise alimentaire (Zizzari et al 2005). Une étude a de plus montré une action agoniste du BIM28163 administré à fortes doses puisque ce dernier induit la prise alimentaire, la prise de poids, ainsi que l'activation neuronale au niveau du DMN de l'hypothalamus (Halem et al 2004, Halem et al 2005). L'action du BIM28163 sur la prise alimentaire pourrait ainsi passer par un récepteur différent du GHS-R1a. Le BIM28131 est quant à lui un puissant stimulateur de la prise alimentaire et de la sécrétion de GH (Palus et al 2011, Strassburg et al 2008).

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de ces deux peptides sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire ainsi que leurs sites d'action au niveau du système nerveux central et les avons comparés à ceux de la ghréline chez des souris sauvages.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets des BIM28163 et 28131 ainsi que de la ghréline chez les souris *ghrl*^{-/-} qui n'expriment aucun des peptides dérivés de la préproghréline et que nous avons caractérisées lors notre précédente étude. Nous avons également testé l'impact de l'obestatine, inhibiteur naturel des effets de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire, chez ces souris *ghrl*^{-/-}.

Actions of agonists and antagonists of the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion, appetite and cFos activity

Rim Hassouna¹, Alexandra Labarthe¹, Philippe Zizzari¹, Catherine Videau¹, Michael Culler², Jacques Epelbaum¹ and Virginie Tolle¹

¹UMR-S 894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

²IPSEN, 27 Maple Street, Milford, MA, USA

All correspondence and reprint requests should be addressed to:

Virginie Tolle

UMR894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences

2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Phone : +33 (0) 1 40 78 92 75

Fax : +33 (0) 1 45 80 72 93

e-mail : virginie.tolle@inserm.fr

Key words: Ghrelin, GHS-R, BIM-28163, BIM-28131, agonist, antagonist, food intake, GH secretion, cFos

In revision in Frontiers in Neuroendocrine Science

ABSTRACT

The stimulatory effects of ghrelin, a 28-AA acylated peptide originally isolated from stomach, on GH secretion and feeding are exclusively mediated through the growth hormone secretagogue 1a receptor (GHS-R1a), the only ghrelin receptor described so far. Several GHS-R1a agonists and antagonists have been developed to treat metabolic or nutritional disorders but their mechanisms of action in the central nervous system remain poorly understood.

In the present study, we compared the activity of BIM-28163, a GHS-R1a antagonist and of several agonists, including native ghrelin and the potent synthetic agonist, BIM-28131, to modulate food intake, GH secretion and c-Fos activity in ArcN, NTS and AP in wild-type and NPY-GFP mice.

BIM-28131 was as effective as ghrelin in stimulating GH secretion, but more active than ghrelin in inducing feeding. It stimulated cFos activity similarly to ghrelin in the NTS and AP but was more powerful in the ArcN, suggesting that the super-agonist activity of BIM-28131 is mostly mediated in the ArcN. BIM-28163 antagonized ghrelin-induced GH secretion but not ghrelin-induced food consumption and cFos activation, rather it stimulated food intake and cFos activity without affecting GH secretion. The level of cFos activation was dependent on the region considered: BIM-28163 was as active as ghrelin in the NTS, but less active in the ArcN and AP. All compounds also induced cFos immunoreactivity in ArcN NPY neurons but BIM-28131 was the most active.

In conclusion, these data demonstrate that two peptide analogs of ghrelin, BIM-28163 and BIM-28131, are powerful stimulators of appetite in mice, acting through pathways and key brain regions involved in the control of appetite that are only partially superimposable from those activated by ghrelin. A better understanding of the molecular pathways activated by these compounds could be useful in devising future therapeutic applications, such as for cachexia and anorexia.

INTRODUCTION

Ghrelin is a 28 amino acid acylated peptide originally discovered in stomach tissues by inverse pharmacology (Kojima et al., 1999) as the endogenous ligand for the Growth Hormone Secretagogue 1a Receptor (GHS-R1a), an orphan receptor cloned a few years earlier from pig pituitaries (Howard et al., 1996). GH secretagogues are a family of synthetic peptidic or non-peptidic compounds developed from the early 1980's to stimulate GH secretion (Bluet-Pajot et al., 2001). As anticipated, ghrelin was initially described for its ability to stimulate growth hormone (GH) secretion in several species including rodents and humans (Kojima et al., 1999; Tolle et al., 2001) but it is still to date the only orexigenic hormone produced in the gastrointestinal tract (Tschop et al., 2000).

The actions of ghrelin on GH secretion and feeding require the addition of an eight-carbon fatty acid that is attached on a serine in position 3 by the enzyme Ghrelin-O-Acyl-Transferase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008). They are exclusively mediated through the GHS-R1a (Sun et al., 2004), the only ghrelin receptor described so far. GHS-R1a is highly expressed in the hypothalamus, a region involved in the control of GH secretion and appetite, and also in the brainstem that receives informations from gut vagal afferents (Guan et al., 1997; Katayama et al., 2000). Within the hypothalamus, NPY neurons in the arcuate nucleus (ArcN) express the GHS-R1a (Willesen et al., 1999; Tannenbaum et al., 2003), and are a well-characterized target for ghrelin actions (Tannenbaum et al., 2003; Chen et al., 2004). Nevertheless, several studies have suggested that certain ghrelin actions may be mediated through a receptor that has yet to be identified.

Several GHS-R1a antagonists have been developed to decipher the function of the ghrelin/GHS-R pathway in the regulation of feeding behavior and GH secretion (Asakawa et al., 2003; Okimura et al., 2003; Beck et al., 2004; Halem et al., 2004; Demange et al., 2007; Esler et al., 2007; Petersen et al., 2009; Costantini et al., 2011; Moulin et al., 2012). Although they have all been clearly shown to antagonize exogenous ghrelin actions on GH secretion both in *in vitro* systems and *in vivo*, their biological effects per se on several biological parameters are contradictory and their mechanisms of action in the central nervous system remain poorly understood. Indeed, intracerebroventricular injections of two antagonists, [D-Lys3]-GHRP6, an analog of one of the synthetic GHS (Asakawa et al., 2003) or [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7,9,Leu-11]-substance P, an analog of substance P (Petersen et al., 2009) induces suppression of feeding in mice. In contrast, [D-Lys3]-GHRP6 has no action on spontaneous ultradian GH secretion (Okimura et al., 2003). But results are biased by the fact that [D-Lys3]-GHRP6 also binds to all melanocortin receptors (Schiöth et al., 1997) and [D-Arg-1, D-Phe-5, D-

Trp-7,9,Leu-11]-substance P also has full inverse agonist action *in vitro* and *in vivo* (Holst et al., 2003; Petersen et al., 2009). To date, the effects of JMV2810, another recently developed GHS-R1a antagonist, on spontaneous feeding or GH secretion have not been reported (Demange et al., 2007).

Only the full-length ghrelin analog, BIM-28163 (now called RM-28163), has been tested on both spontaneous GH secretion and food intake. Treatment with this selective GHS-R1a antagonist over 48h in rats reduces pulsatile GH secretion (Zizzari et al., 2005). In contrast, it increases food intake and weight gain as effectively as ghrelin when administered at 5 to 10-fold higher doses than ghrelin (Halem et al., 2004; Halem et al., 2005). Interestingly, BIM-28163 induces cFos activation in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) while it acts as an antagonist in the ArcN of the hypothalamus. These data are corroborated by a more recent study also describing a stimulatory effect of another GHS-R1a antagonist, GSK1614343, on feeding in rats and dogs (Costantini et al., 2011). Altogether these data are intriguing and suggest the existence of an unknown pathway mediating the effects of these ghrelin antagonists on feeding through either the GHS-R1a or another unknown receptor. Understanding the mechanisms of action of this compound that differentially affect feeding and GH secretion can be of clinical interest.

In the present study, we compared the effect of BIM-28163, BIM-28131 (Strassburg et al., 2008; Palus et al., 2011), native ghrelin and the combination of BIM-28163+ghrelin in the modulation of food intake, GH secretion and cFos activity in fed mice. Our aim was to map changes in cFos activation in several key brain regions controlling appetite and/or GH secretion, including the hypothalamic arcuate nucleus (ArcN), ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), Nucleus Tractus Solitarius (NTS) and Area Postrema (AP) of the brainstem. In addition, we used NPY-GFP mice to test whether the feeding effects of the analogs were mediated, like ghrelin, through the orexigenic NPY neurons.

MATERIAL AND METHODS

Animals

18-25 week old C57BL6/J male and female mice, obtained either from Charles River or from our own colony, were used for feeding experiments. 18-25 week old C57BL6/J or NPY-Renilla GFP transgenic male and female mice backcrossed on the C57BL6/J background and expressing Renilla GFP under the transcriptional control of the NPY genomic sequence (Van Den Pol et al., 2009) were used for cFos experiments. Mice were housed at constant temperature and humidity, with a fixed 12-h light/dark cycle (lights-on at 7.00 am) and free access to food and water. In addition, the animals were handled weekly to minimize stress. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the Animal Experimentation Committee of Paris Descartes University.

Peptides

Native ghrelin, BIM-28131 (a small peptide ghrelin agonist) and BIM-28163 (a full-length ghrelin analog antagonist) were obtained from IPSEN (Milford, MA, USA). Peptides were dissolved in a vehicle containing 0.9% saline + 0.25% of Bovin serum albumin (BSA).

Automated food intake monitoring

One week prior to the experiments, 18-25 week old C57BL6/J male mice were individually housed and acclimatized to the automated drinking/feeding stations (TSE Systems, GmbH, Germany). Feeding behavior was recorded continuously by means of high precision sensors, attached to the top of the cage lids. Meal patterns were analyzed using the following definition: a meal consists of the consumption of 0.03 g of food separated from the next feeding episode by at least 10 min as previously described (Yu et al., 2009; Stengel et al., 2010; Wang et al., 2011). For each mouse, the meal number, the total meal size (g) and the total meal duration (min) were measured within 4 hours following peptide injections.

Experiments were performed during the light phase (10.00-11.00 am) and carried out in a cross-over designed manner so that each mouse received all treatments randomly separated by two washout days. On each experimental day, mice were injected intraperitoneally (ip) with either vehicle (0.9% saline containing 0.25% BSA), native ghrelin (30 nmol), BIM-28131 (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol)

or native ghrelin (30 nmol) combined with BIM-28163 (150 nmol).

c-Fos Immunohistochemistry, feeding and GH measurements

18-25 week old male and female C57BL6/J and NPY-GFP mice were individually housed and had free access to food and water at the time of injections. Vehicle, native ghrelin (30 nmol), BIM-28131 (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol) or native ghrelin (30 nmol) combined with BIM-28163 (150 nmol) were injected ip in the early light phase (9.00-11.00 am).

A pre-weighed amount of food was distributed in each cage at the time of injections and weighed 90 minutes later in order to confirm the effects of the treatments on food consumption and to correlate food intake to the number of activated cFos nuclei. 15 minutes following the injection, 4 µl of whole blood was withdrawn from the tail vein, homogenized in 116 µL of GH buffer (PBS, 0.05% Tween) for GH measurements. Whole blood GH concentrations were evaluated by EIA as previously described (Steyn et al., 2011).

The number of nuclei immunoreactive for cFos protein were quantified 90 minutes after ip injection of peptides to determine which brain regions were activated by the compounds. Mice were deeply anesthetized with pentobarbital (5.5 mg/30 g BW) and perfused through the ascending aorta with saline 0.9% for 1 minute followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer 0.1 M (PB) for an additional 9 minutes. The brains were removed, post-fixed for two hours in 4% paraformaldehyde and cryoprotected in 30% sucrose for two days at 4°C. Brains were then frozen in 2 methyl-butane and sectioned in the coronal plane at a thickness of 25-50 µm using a freezing microtome (Frigomobile, Leica, Wetzlar, Germany).

For the detection of cFos protein expression, free-floating sections were processed for immunohistochemistry. Sections were incubated in blocking buffer (10% Normal Donkey Serum, 0.3% Triton X-100 in 0.1M TBS) for 1h at room temperature then incubated with rabbit c-Fos antibody (1:20000, Ab-5, Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) in 1% NDS, 0.3% Triton X-100 in 0.1 M TBS overnight at room temperature. Sections were then rinsed 4x10 minutes in 0.1 M TBS and incubated with Cy3 conjugated Donkey Anti-Rabbit antibody (1:800 DAR-Cy3, Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) 1h at room temperature and then rinsed 4x10 minutes in 0.1 M TBS. Sections were mounted with fluoromount and quantified using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) under 40X magnification. Quantifications were performed bilaterally every 100 µm sections through the arcuate nucleus (ArcN, 2.3 to 1.6 mm anterior to the interaural

line) and ventromedial nucleus (VMH, 2.5 to 2.3 mm anterior to the interaural line) of the hypothalamus and in the nucleus tractus solitarius (NTS, 3.7 mm posterior to the interaural line) and area postrema (AP, 3.7 mm posterior to the interaural line) of the brainstem (Franklin and Paxinos., 1997).

NPY neurons were visualized using GFP fluorescence. GFP positive cell bodies expressing cFos were quantified unilaterally under 40X magnification using a confocal SP5 microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Co-localizations were determined with the Image-J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) on series of continuous optical sections with 0.5µm increment along the z-axis of the section.

Statistical analyses

Values are given as mean±SEM. Statistical analyses were performed using ANOVA, repeated measures ANOVA followed by Fisher PLSD post-hoc test using the Statview software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Acknowledgements

This work was supported by an IPSEN grant to VT and JE.

We are grateful to Alice Cougnon for the care of the animals and to Julie Cognet for technical assistance.

The compounds utilized in this study, BIM-28131 and BIM-28163, are now known as RM131 and RM163. RM131 is currently in clinical development by Rhythm, Boston, MA.

RESULTS

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on feeding behavior. Feeding was monitored after intraperitoneal injections of native ghrelin (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol), BIM-28131 (30 nmol) or after co-administration of native ghrelin+BIM-28163 in the early light phase. In a separate subset of animals, feeding was monitored manually after injection of the treatments in separate groups of animals. Ninety minutes after the injections, a significant effect of treatment on food consumption was observed (Figure 1A). Although native ghrelin increased food intake by 2-fold, the effect of this compound was not significant. Only BIM-28131 and BIM-28163 increased food consumption significantly with BIM-28131 being 3 times more effective and BIM-28163 2 times more effective than ghrelin, respectively. Food intake was identical after co-administration of BIM-28163 and native ghrelin or after administration of ghrelin alone. Automated feeding stations were also used to monitor cumulative food intake meal pattern during seven hours following the injection in a separate set of mice: animals received each treatment randomly in a cross-over designed manner (Figure 2 and Table 1). When data were analyzed as repeated measures in the same mouse and over time, there was a significant interaction between time and treatment. BIM-28131 was the only compound to stimulate appetite even in mice that did not respond well to ghrelin. Increased food consumption in this group was associated with a tendency to increased meal number, total meal size and total meal duration (Table 1).

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on GH secretion. GH plasma levels were monitored 15 minutes following the injections in the same animals used to monitor food intake manually (Figure 1B). Native ghrelin and BIM-28131 equally stimulated GH secretion whereas GH secretion was not increased after injection of BIM-28163 alone. In contrast to feeding, BIM-28163 antagonized ghrelin-induced GH secretion.

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on cFos activation in the hypothalamic arcuate nucleus (ArcN). cFos activation was monitored after intraperitoneal injections of native ghrelin (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol), BIM-28131 (30 nmol) or after co-administration of native ghrelin+BIM-28163 in the early light phase. Repeated measures ANOVA over the rostro-caudal extent of the ArcN showed an effect of treatment on cFos immunoreactive nuclei (Figure 3A). All treatment groups were significantly elevated compared to the vehicle-treated group, except BIM-28163 which had a modest effect (Figure 3B). Injection of native ghrelin induced cFos activation and this was not antagonized by

co-administration of BIM-28163. Administration of BIM-28131 induced a more pronounced activation than all other treatments. Thus the efficiency of activation in the ArcN was BIM-28131>native ghrelin>native ghrelin+BIM-28163>BIM-28163. Differences were greater around 2.1-2.0 mm anterior to the interaural line where most NPY neurons are localized.

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on cFos activation in the NTS and AP of the brainstem.

cFos activation was also observed in the area postrema (AP) and nucleus of the solitary tract (NTS) (Figure 3C and D). In the NTS, in contrast to the ArcN, all treatments significantly increased the number of cFos-immunoreactive cells. BIM-28131 stimulated cFos as efficiently as native ghrelin. BIM-28163 had an activity *per se* but was inefficient in antagonizing ghrelin-induced cFos. In the AP, the compounds had different activities. Native ghrelin and BIM-28131 had the same efficiency in activating cFos, but BIM-28163 was ineffective.

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on cFos activation in the hypothalamic VMH. In a separate group of animals, cFos activation was quantified in the VMH (Interaural line: -2.5, -2.3). Due to the high level of cFos activation and high variability in vehicle-treated animals, statistical differences were not observed between treatments (Figure 3E). The number of cFos nuclei in vehicle, ghrelin and BIM-28131-treated animals were identical; however, in mice treated with BIM-28163, the number of cFos nuclei was twice as elevated as in ghrelin-treated mice.

Effect of GHS-R1a agonists and antagonists on cFos activation in NPY neurons. To measure c-Fos immunoreactivity in NPY neurons, we used NPY-GFP mice. All treatments induced cFos activation in NPY neurons as compared with vehicle-treated mice (Figure 4 and Table 2). Treatments did not modify the number of GFP-positive neurons. BIM-28131 induced the greatest activation of NPY neurons with more than 20% of NPY cells activated, whereas native ghrelin and BIM-28163 induced cFos in less than 15% of NPY neurons (Table 2).

DISCUSSION

The present study demonstrates that two GHS-R1a synthetic ligands, BIM-28163 and BIM-28131, are powerful stimulators of appetite in mice, acting through pathways and brain regions that are distinct from the ones activated by ghrelin.

BIM-28163 is a full GHS-R1a antagonist as it has no intrinsic activity at the GHS-R1a, and can fully block the ability of ghrelin to activate the GHS-R1a, as well as block ghrelin-induced GH release, both *in vitro* and *in vivo* (Halem et al., 2004). It is thus a pharmacological tool to dissect the role of endogenous ghrelin. However, whereas previous investigations in rats with this GHS-R1a antagonist revealed a role of the endogenous ligand in amplifying GH pulsatile pattern, blocking GHS-R1a fails to inhibit food intake (Zizzari et al., 2005) and BIM-28163 even stimulates appetite and weight gain after daily treatment in rats (Halem et al., 2004; Halem et al., 2005). In the current study performed in mice, we also demonstrate that acute injection of BIM-28163 increases food consumption and show for the first time that the compound induces cFos in two brain regions involved in the control of appetite, the hypothalamus and brainstem. The feeding effect of BIM-28163 is observed as early as 15-30 minutes after its injection (ie same time-course as native ghrelin) (data not shown).

It was previously described in the rat that intraperitoneal (ip) injection of native ghrelin in the early light phase induces feeding and cFos activation in the ArcN, NTS and AP (Hewson and Dickson, 2000; Lawrence et al., 2002; Takayama et al., 2007). A dose of 30 nmol/30 g body weight was chosen here based on a published study showing that this dose stimulates food intake in mice (Zizzari et al., 2007). Although ghrelin was very potent in activating cFos in the ArcN, NTS and AP in the present study, its effects on feeding did not reach statistical significance. It may be due to the fact that different sets of animals were used for feeding experiments and cFos experiments. Another possible interpretation is that cFos activation in these nuclei is required but not alone sufficient to induce an effect on appetite. We indeed recently observed that after ip injection of ghrelin, animals can be subdivided into two groups: high and low responders, suggesting an interindividual variability in the feeding effects of ghrelin (Hassouna et al., 2012b).

BIM-28131 is a super-agonist with regard to food intake in rats (Strassburg et al., 2008; Palus et al., 2011). It is also very potent to stimulate both appetite and cFos in the current study even in mice that were not responsive to ghrelin in the cross-over designed study. Differences in stability between

native ghrelin and BIM-28131 would partly explain the differential activities of these two compounds. Indeed, in addition to a 5-fold higher affinity than native ghrelin in binding to the GHS-R1a and a 10-fold increased potency in activating the receptor, BIM-28131 has a 10-fold greater circulating half-life. However, BIM-28131 is comparable to ghrelin with regard to stimulating GH secretion. The equal effect on GH release may be possible because the action of the compounds may be partly relayed at the pituitary level and the time of blood sampling occurred after a relatively short time (15 minutes) whereas the food intake was measured over 90 minutes or greater. By analyzing the feeding response every 15 minutes following the injection, BIM-28131 did not have a stronger feeding effect over native ghrelin at 15-30 min post-injection (data not shown) but from 60 minutes following the injection. Thus, BIM-28131 is more powerful than ghrelin in stimulating appetite at equimolar doses, and is also more powerful in activating cFos in the ArcN, but not in the NTS and AP, suggesting that the activity of this super-agonist is mostly mediated in the ArcN. This is further substantiated by cFos activation in orexigenic NPY ArcN neurons in BIM-28131 treated mice as compared with ghrelin-treated ones. NPY neurons are well-known targets for ghrelin actions (Tannenbaum et al., 2003; Chen et al., 2004) and induction of cFos in NPY neurons in rats was previously demonstrated with other ghrelin agonists (Dickson and Luckman, 1997).

In the current study, BIM-28163 activates several brain nuclei. The intensity of activation seems to be different depending on the region and relative to that of native ghrelin. BIM-28163 appears to have greater activity in the NTS than in the ArcN and AP, two structures outside the blood brain barrier (BBB). Indeed, in the NTS, BIM-28163 is as potent as both native ghrelin and BIM-28131 in inducing cFos with more than a 2-fold increase as compared with saline treated animals although the effect does not reach statistical significance. In the ArcN, however, BIM-28163 is not as effective as ghrelin in stimulating cFos, and is much less active than BIM-28131. This suggests that BIM-28163 uses alternative pathways other than through these BBB free structures to relay its orexigenic actions. These data are consistent with previous reports in rats showing that BIM-28163 selectively activates cFos in the DMH after icv injections, whereas, in the ArcN, it acts exclusively as an antagonist by blocking ghrelin-induced cFos activation without any intrinsic effect (Halem et al., 2004; Halem et al., 2005). Our data here slightly differ from the above studies in rats because BIM-28163 still activates cFos in the ArcN, although to a much lesser extent than ghrelin. In addition, we were not able to observe any antagonistic actions of BIM-28163 either on food intake or cFos activity when co-administered with ghrelin. Differences may be due to the species studied (mouse vs rat), to the mode of administration (ip vs icv), as well as the dose injected (5 nmol/g ip versus 1,5 nmol/rat icv).

Differences in antagonizing ghrelin-induced food consumption or cFos may be due to the fact that BIM-28163 was injected at a 5-fold higher dose than ghrelin instead of a 10-fold higher dose (IC₅₀ for BIM-28163 at GHS-R1a is 10 fold higher than for native ghrelin). However, the antagonistic effect of BIM-28163 on ghrelin-induced cFos activity in rats was still observed when BIM-28163 was administered at a 5-fold dose (Halem et al., 2005). The recent report by Costantini et al (Costantini et al., 2011) shows that another novel and selective GHS-R1a antagonist with no partial agonist activity, GSK1614343 was also not able to antagonize ghrelin-induced food intake at a dose of 10 mg/kg.

Concerning the VMH, a high level of activation and high interindividual variability in vehicle-treated animals are observed. Consequently, ghrelin seems to have no stimulatory action in this nucleus. This is consistent with other data in rats showing that ghrelin does not activate cFos in the VMH (Lawrence et al., 2002). In contrast, the number of cFos positive nuclei after treatment with BIM-28163 is almost 2-fold higher than in the ghrelin-treated group.

Within the hypothalamus, the ArcN is one of the main targets of peripheral signals, such as leptin and ghrelin, which relay information about energy stores and/or nutritional status. The efficiency of the compounds used in this study in activating the ArcN is BIM-28131>native ghrelin>native ghrelin+BIM-28163>BIM-28163. The GHS-R1a has been shown to be co-expressed with several neuropeptides in the ArcN. It is expressed on the orexigenic NPY and GHRH neurons (Willesen et al., 1999; Tannenbaum et al., 2003) and these populations of neurons relay ghrelin orexigenic and GH-releasing actions in rats (Tannenbaum et al., 2003; Chen et al., 2004). In mice, ghrelin also induces cFos in NPY-expressing neurons (Wang et al., 2002). To determine whether BIM-28163 and BIM-28131 orexigenic actions could be partly mediated through NPY neurons as is the case for ghrelin, we investigated the effect of these compounds in NPY-GFP mice. Indeed, ip administration of 30 nmol ghrelin during the light cycle induced cFos activation in approximately 26% of NPY neurons (Hassouna et al., 2012a; Hassouna et al., 2012b). Here we observed that about 15% of NPY-positive cells were activated after BIM-28163 or native ghrelin administration whereas about 20% were activated after BIM-28131 treatment. The orexigenic action of BIM-28163 could be partly mediated through an activation of ArcN NPY neurons. Orexigenic actions of ghrelin may also be mediated by a reduced activity in POMC cells (Cowley et al., 2003). Modified activity of the anorexigenic POMC neurons after treatment with GHS-R1a compounds can thus not be excluded. Orexigenic actions of GSK1614343, another GHS-R1a antagonist, was accompanied by a reduced expression of POMC in the ArcN after chronic treatment with the compound (Costantini et al., 2011).

Although the majority of studies demonstrated that acylation is essential for ghrelin feeding activities (Inhoff et al., 2009), one study showed that desacyl ghrelin was able to stimulate food intake after

intracerebroventricular administration by a mechanisms independent of the GHS-R1a (Toshinai et al., 2006). Interestingly, feeding effects of desacyl ghrelin was more pronounced in GHS-R1a deficient mice. Thus it can be postulated that blocking the GHS-R1a with the antagonist may allow desacyl to stimulate feeding through a GHS-R1a independent pathway. Whereas a distinct receptor from the known GHS-R1a would possibly mediate the orexigenic actions of BIM-28163, we can not exclude that these effects are also dependent on the GHS-R1a. Indeed, a recent study using the antagonist, GSK-1614343, showed that the appetite-mediated action of this compound was abolished in GHS-R null mice (Costantini et al., 2011), suggesting that the orexigenic effects of GSK-1614343 is relayed by GHS-R1a or that the ghrelin receptor may be needed. GHS-R1a is associated with multiple signal transduction pathways (Carreira et al., 2004; Holst et al., 2005) and it is possible that BIM-28163 could activate a specific pathway on the GHS-R1a that is independent from the one mediating GH-releasing activities. In addition, the formation of heterodimers between the GHS-R1a and other receptors has been evidenced (Kern et al., 2012), and raises the question as to whether the orexigenic actions of BIM-28163 could be mediated through interaction with a GHS-R1a dimer that differs from the GHS-R1a receptor form that regulates GH secretion. BIM-28163 could possibly interact with a receptor that needs to dimerize with the GHS-R1a.

The present study demonstrates that two GHS-R1a synthetic ligands, BIM-28163 and BIM-28131, are powerful stimulators of appetite in mice, acting through pathways and brain regions that are distinct from those activated by ghrelin.

In conclusion, utilization of synthetic GHS-R1a ligands, such as BIM-28163 and BIM-28131 that are powerful stimulators of appetite and act through pathways that are distinct from those activated by ghrelin, even in situations when ghrelin seems modestly effective, can have important clinical implications, in conditions such as cachexia or anorexia (*see other chapter in the same issue: Ghrelin: Central and Peripheral Implications in Anorexia Nervosa*, (Mequinion et al., 2012)). BIM-28131 was previously demonstrated to be very efficient in a rat heart failure model of cachexia (Strassburg et al., 2008; Palus et al., 2011). In addition, observations that BIM-28163 is able to selectively stimulate feeding and increase weight gain without altering GH secretion may suggest the possibility of treating pathologies in which hyper-activity of the GH/IGF-1 axis may be deleterious. A better understanding of the molecular pathways activated by these compounds will be useful for devising future therapeutic applications.

BIBLIOGRAPHY

- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Katsuura, G., Fujimiya, M., Fujino, M.A., and Kasuga, M. (2003). Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52, 947-952.
- Beck, B., Richy, S., and Stricker-Krongrad, A. (2004). Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci* 76, 473-478.
- Bluet-Pajot, M.T., Tolle, V., Zizzari, P., Robert, C., Hammond, C., Mitchell, V., Beauvillain, J.C., Viollet, C., Epelbaum, J., and Kordon, C. (2001). Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine* 14, 1-8.
- Carreira, M.C., Camiña, J.P., Smith, R.G., and Casanueva, F.F. (2004). Agonist-specific coupling of growth hormone secretagogue receptor type 1a to different intracellular signaling systems. Role of adenosine. *Neuroendocrinology* 79, 13-25.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.M., Ye, Z., Nargund, R.P., Smith, R.G., Van Der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Macneil, D.J., and Qian, S. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607-2612.
- Costantini, V.J., Vicentini, E., Sabbatini, F.M., Valerio, E., Lepore, S., Tessari, M., Sartori, M., Michielin, F., Melotto, S., Bifone, A., Pich, E.M., and Corsi, M. (2011). GSK1614343, a novel ghrelin receptor antagonist, produces an unexpected increase of food intake and body weight in rodents and dogs. *Neuroendocrinology* 94, 158-168.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., and Horvath, T.L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.
- Demange, L., Boeglin, D., Moulin, A., Mousseaux, D., Ryan, J., Bergé, G., Gagne, D., Heitz, A., Perrissoud, D., Locatelli, V., Torsello, A., Galleyrand, J.-C., Fehrentz, J.-A., and Martinez, J. (2007). Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. 1. *J Med Chem* 50, 1939-1957.
- Dickson, S.L., and Luckman, S.M. (1997). Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 138, 771-777.
- Esler, W.P., Rudolph, J., Claus, T.H., Tang, W., Barucci, N., Brown, S.E., Bullock, W., Daly, M., Decarr, L., Li, Y., Milardo, L., Molstad, D., Zhu, J., Gardell, S.J., Livingston, J.N., and Sweet, L.J. (2007). Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148, 5175-5185.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (1997). *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., Mckee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G., Van Der Ploeg, L.H., and Howard, A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48, 23-29.
- Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E., and Hale, J.E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6320-6325.
- Halem, H.A., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Shen, Y., Datta, R., Abizaid, A., Diano, S., Horvath, T., Zizzari, P., Bluet-Pajot, M.T., Epelbaum, J., and Culler, M.D. (2004). Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 1, S71-75.
- Halem, H.A., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Shen, Y., Datta, R., Abizaid, A., Diano, S., Horvath, T.L., and Culler, M.D. (2005). A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist

- that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology* 81, 339-349.
- Hassouna, R., Viltart, O., Tallot, L., Bouyer, K., Videau, C., Epelbaum, J., Tolle, V., and Badoer, E. (2012a). "Visualization Techniques. From Immunohistochemistry to Magnetic Resonance Imaging," in *Visualization Techniques. From Immunohistochemistry to Magnetic Resonance Imaging*, ed. E. Badoer. (Australia: Humana Press), 207-223.
- Hassouna, R., Zizzari, P., Viltart, O., Yang, S.-K., Gardette, R., Videau, C., Badoer, E., Epelbaum, J., and Tolle, V. (2012b). A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice. *PLoS One*.
- Hewson, A.K., and Dickson, S.L. (2000). Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12, 1047-1049.
- Holst, B., Brandt, E., Bach, A., Heding, A., and Schwartz, T.W. (2005). Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Molecular Endocrinology* 19, 2400-2411.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T.H., Ankersen, M., and Schwartz, T.W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology* 17, 2201-2210.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberato, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., Mckee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., Demartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., and Van Der Ploeg, L.H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 974-977.
- Inhoff, T., Wiedenmann, B., Klapp, B.F., Mönnikes, H., and Kobelt, P. (2009). Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? *Peptides* 30, 991-994.
- Katayama, M., Nogami, H., Nishiyama, J., Kawase, T., and Kawamura, K. (2000). Developmentally and regionally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor mRNA in rat brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 72, 333-340.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., and Smith, R.G. (2012). Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73, 317-332.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Lawrence, C.B., Snape, A.C., Baudoin, F.M.-H., and Luckman, S.M. (2002). Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143, 155-162.
- Mequinion, M., Langlet, F., Zgheib, S., Dehouck, B., Chauveau, C., and Viltart, O. (2012). Ghrelin: Central and peripheral implications in anorexia nervosa. . *Frontiers in Neuroendocrine Science*.
- Moulin, A., Brunel, L., Boeglin, D., Demange, L., Ryan, J., M'kadmi, C., Denoyelle, S., Martinez, J., and Fehrentz, J.A. (2012). The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids*.
- Okimura, Y., Ukai, K., Hosoda, H., Murata, M., Iguchi, G., Iida, K., Kaji, H., Kojima, M., Kangawa, K., and Chihara, K. (2003). The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. *Life Sci* 72, 2517-2524.
- Palus, S., Schur, R., Akashi, Y.J., Bockmeyer, B., Datta, R., Halem, H., Dong, J., Culler, M.D., Adams, V., Anker, S.D., and Springer, J. (2011). Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model. *PLoS One* 6, e26865.
- Petersen, P.S., Woldbye, D.P.D., Madsen, A.N., Egerod, K.L., Jin, C., Lang, M., Rasmussen, M., Beck-Sickinger, A.G., and Holst, B. (2009). In Vivo Characterization of High Basal Signaling from the Ghrelin Receptor. *Endocrinology* 150, 4920-4930.
- Schioth, H.B., Muceniece, R., and Wikberg, J.E. (1997). Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides* 31, 565-571.

- Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Rivier, J., Kobelt, P., Monnikes, H., and Tache, Y. (2010). Activation of brain somatostatin 2 receptors stimulates feeding in mice: analysis of food intake microstructure. *Physiol Behav* 101, 614-622.
- Steyn, F.J., Huang, L., Ngo, S.T., Leong, J.W., Tan, H.Y., Xie, T.Y., Parlow, A.F., Veldhuis, J.D., Waters, M.J., and Chen, C. (2011). Development of a method for the determination of pulsatile growth hormone secretion in mice. *Endocrinology* 152, 3165-3171.
- Strassburg, S., Anker, S.D., Castaneda, T.R., Burget, L., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Nogueiras, R., Halem, H., Dong, J.Z., Culler, M.D., Datta, R., and Tschop, M.H. (2008). Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E78-84.
- Sun, Y., Wang, P., Zheng, H., and Smith, R.G. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4679-4684.
- Takayama, K., Johnno, Y., Hayashi, K., Yakabi, K., Tanaka, T., and Ro, S. (2007). Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. *Neurosci Lett* 417, 292-296.
- Tannenbaum, G.S., Epelbaum, J., and Bowers, C.Y. (2003). Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144, 967-974.
- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M.C., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.T. (2001). In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73, 54-61.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M.S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2006). Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147, 2306-2314.
- Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.
- Van Den Pol, A.N., Yao, Y., Fu, L.-Y., Foo, K., Huang, H., Coppari, R., Lowell, B.B., and Broberger, C. (2009). Neuromedin B and Gastrin-Releasing Peptide Excite Arcuate Nucleus Neuropeptide Y Neurons in a Novel Transgenic Mouse Expressing Strong Renilla Green Fluorescent Protein in NPY Neurons. *Journal of Neuroscience* 29, 4622-4639.
- Wang, L., Saint-Pierre, D.H., and Tache, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 325, 47-51.
- Wang, L., Stengel, A., Goebel, M., Martinez, V., Gourcerol, G., Rivier, J., and Tache, Y. (2011). Peripheral activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits food intake and alters meal structures in mice. *Peptides* 32, 51-59.
- Willesen, M.G., Kristensen, P., and Rømer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70, 306-316.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., and Goldstein, J.L. (2008). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 387-396.
- Yu, Y., South, T., and Huang, X.F. (2009). Inter-meal interval is increased in mice fed a high whey, as opposed to soy and gluten, protein diets. *Appetite* 52, 372-379.
- Zizzari, P., Halem, H., Taylor, J., Dong, J.Z., Datta, R., Culler, M.D., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.T. (2005). Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology* 146, 3836-3842.
- Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.T. (2007). Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148, 1648-1653.

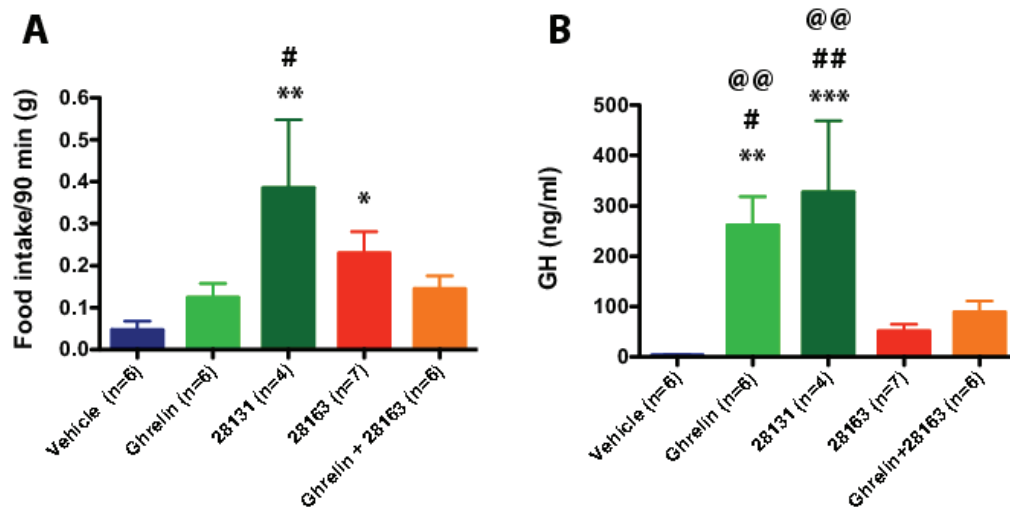


Figure 1. Effect of native ghrelin and BIM compounds on cumulative food intake and GH secretion measured during the light cycle in mice. Data represent mean \pm SEM. (A) Mean cumulative food intake (90 minutes) after ip injection of native ghrelin (30 nmol), BIM-28131 (30 nmol), BIM-28163 (150 nol) and native ghrelin (30 nmol) co-administered with BIM-28163 (150 nmol). ANOVA shows an effect of treatment on 90 minutes food intake: * p <0.05 BIM-28163 vs vehicle, ** p <0.01 BIM-28131 vs vehicle and native ghrelin, # p <0.05 BIM-28131 vs native ghrelin+BIM-28163, Fisher PLSD post-hoc test. (B) GH secretion measured by tail bleeding 15 minutes after ip injection of BIM compounds in the same animals. ANOVA shows an effect of treatment on GH levels: ** p <0.01 native ghrelin vs vehicle, *** p <0.001 BIM-28131 vs vehicle, # p <0.05 BIM-28131 vs native ghrelin+BIM-28163, # p <0.05 native ghrelin vs native ghrelin+BIM-28163, @@ p <0.01 native ghrelin or BIM-28131 vs BIM-28163, Fisher PLSD post-hoc test

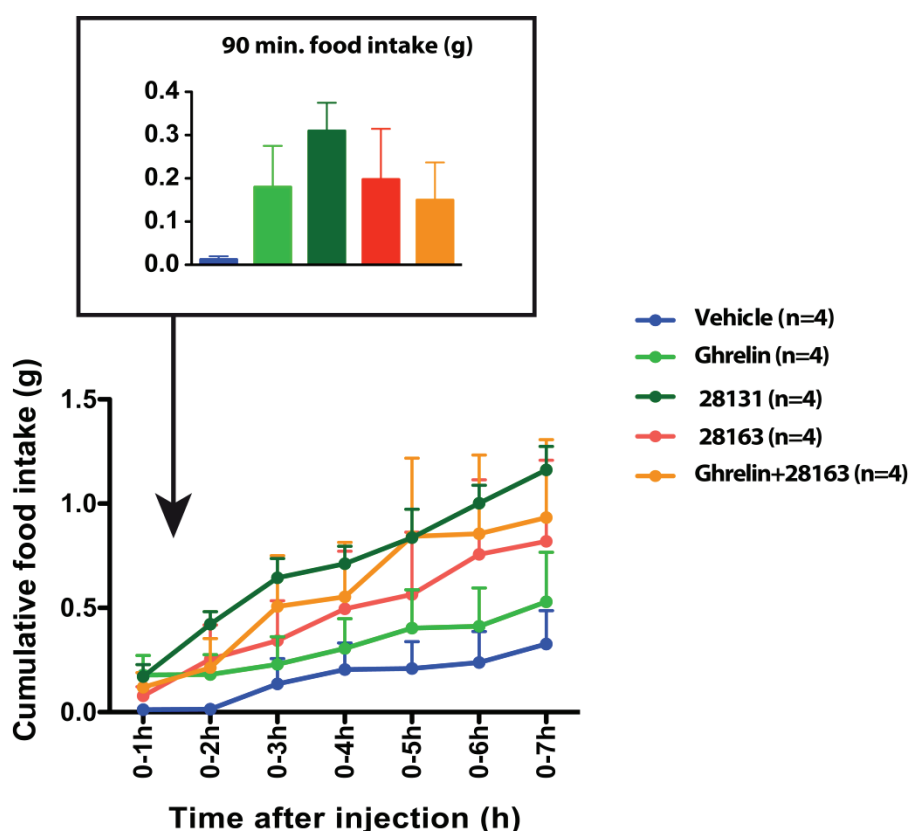


Figure 2. Effect of native ghrelin and BIM compounds on cumulative food intake and meal pattern measured with the automated feeding station in mice. Mean cumulative food intake (0-7h) after ip injection of native ghrelin (30 nmol), BIM-28131 (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol) and native ghrelin (30 nmol) co-administered with BIM-28163 (150 nmol). Data represent mean \pm SEM. Repeated measures ANOVA over time (7 hours) and across treatments shows an interaction between time and treatment on cumulative food intake. $P=0.06$ BIM-28131 vs vehicle.

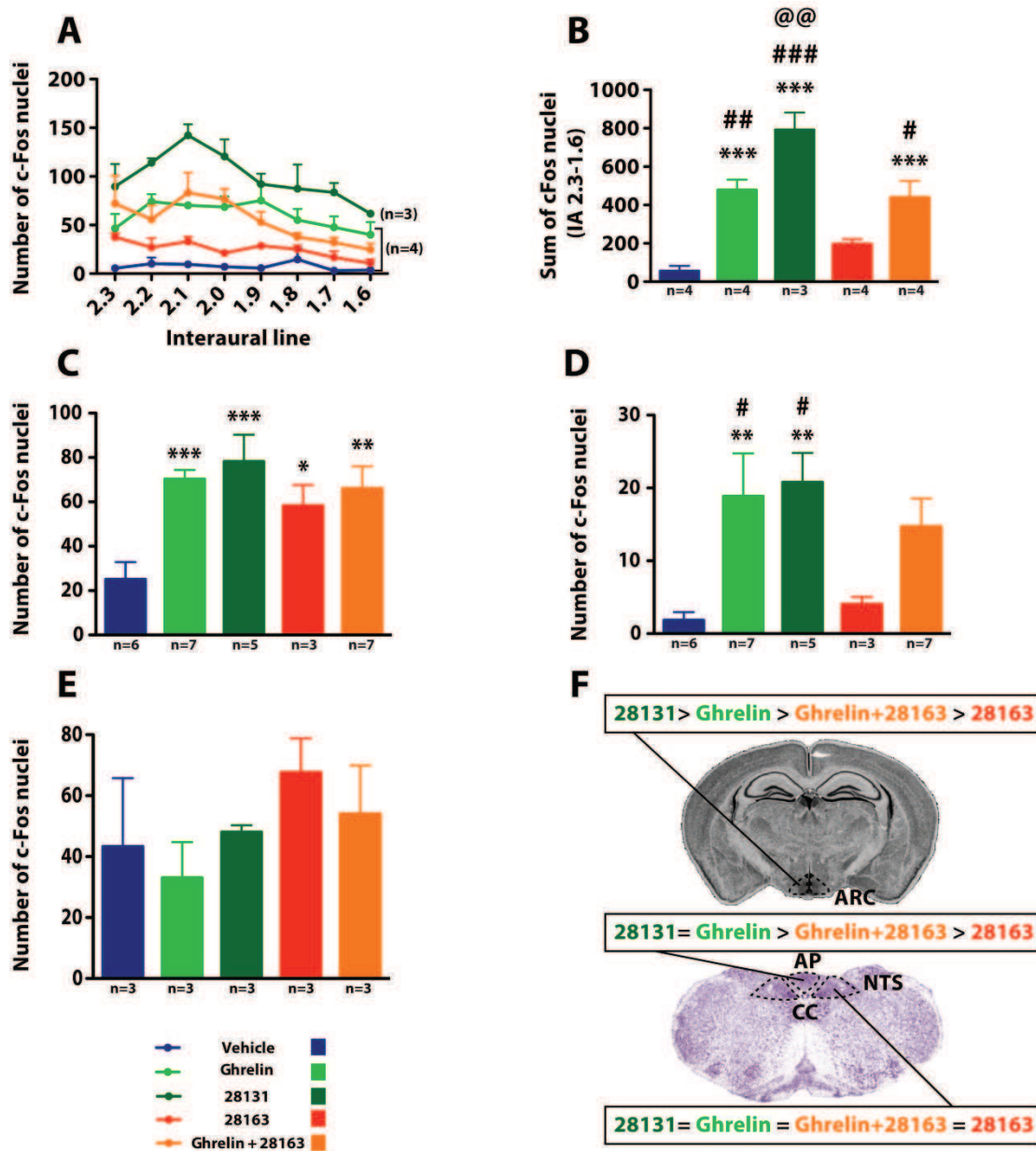


Figure 3. Effect of native ghrelin and BIM compounds on cFos immunoreactivity in mice in the ArcN, AP, NTS and VMH. (A) Number of cFos immunoreactive nuclei and (B) sum of cFos immunoreactive nuclei along the rostro-caudal extent of the ArcN (2.3-1.6 mm anterior to the interaural line). Data represent mean±SEM. (A) Repeated measures ANOVA over the rostro-caudal extent of the ArcN shows an effect of treatment on the number of cFos positive nuclei: ***P<0.0001 native ghrelin vs Vehicle, BIM-28163 and BIM-28131, ####P<0.0001 BIM-28131 vs all other treatments, @@@P<0.0001 BIM-28163 vs all other treatments except vehicle, **P<0.01 BIM-28163 vs vehicle, @@@P<0.0001 native ghrelin+BIM-28163 vs vehicle, BIM-28163 and BIM-28131, Fisher PLSD post-hoc test. (B) **P<0.01 native ghrelin vs 28163, ####P<0.0001 native ghrelin vs vehicle, ***P<0.01 28131 vs vehicle

and 28163, ^{##}P<0.001 28131 versus native ghrelin and native ghrelin+28163, ^{@@@}P<0.001 ghrelin+28163 vs vehicle, Fisher PLSD post-hoc test. (C and D) Number of cFos immunoreactive nuclei in the NTS and AP (3.7 mm posterior to the interaural line). Data represent mean±SEM. ANOVA shows an effect of treatment on the number of cFos nuclei in the NTS and AP. *P<0.05 vs vehicle, **P<0.01 vs vehicle, [#]P<0.05 vs 28163, Fisher PLSD post-hoc test. (E) Number of cFos immunoreactive nuclei in the VMH (2.5 to 2.3 mm anterior to the interaural line). Data represent mean±SEM. No significant effect of treatments is observed in the VMH. (F) Summary of the effect of the different BIM compounds on cFos activation in the ArcN, NTS and AP. Cc: central canal.

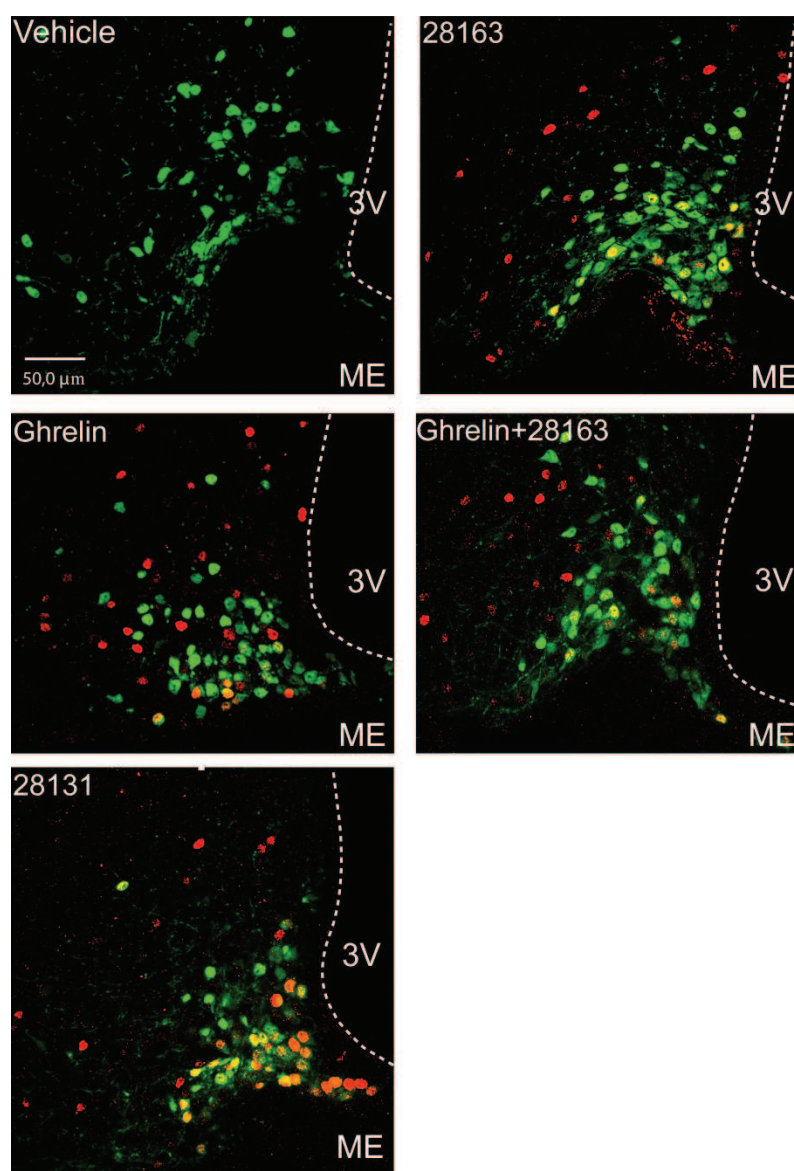


Figure 4. Effect of native ghrelin and BIM compounds on cFos immunoreactivity in ArcN NPY neurons in NPY-Renilla GFP mice. Representative confocal microphotographs showing GFP neurons (green), cFos nuclei (red) and the merge of both signals (yellow/orange) in coronal sections of the ArcN at approximately 2.1-1.9 mm anterior to the interaural line. Data represent mean±SEM. Scale bar represents 50 μm in the ArcN. 3V: Third Ventricle, ME: Median Eminence.

Table 1. Effect of native ghrelin and BIM compounds on meal pattern measured with the automated feeding station in mice. Meal number, total meal size and total meal duration measured (0-7h) after ip injection of native ghrelin (30 nmol), BIM-28131 (30 nmol), BIM-28163 (150 nmol) and native ghrelin (30 nmol) co-administered with BIM-28163 (150 nmol). Data represent mean±SEM.

	Meal number n=3	Total meal size (g) n=4	Total meal duration (min) n=4
Vehicle	1.25±0.75	0.23±0.15	7.50±4.97
Ghrelin	3.00±1.08	0.41±0.17	15.50±9.90
BIM-28131	4.00±0.41	0.82±0.10	31.50±4.99
BIM-28163	3.50±2.02	0.92±0.57	26.75±14.73
Ghrelin + BIM-28163	3.50±1.04	0.76±0.29	27.75±12.37

Table 2. Effect of native ghrelin and BIM compounds on the number of GFP-positive cells, number of cFos-positive nuclei, number and percentage of GFP-positive cells expressing cFos protein in the ArcN in NPY-Renilla GFP mice. Coronal sections of the ArcN at approximately 2.0-1.9 mm anterior to the interaural line were quantified unilaterally. Data represent mean±SEM.

	GFP-positive cells	cFos-positive nuclei	GFP-positive cells expressing cFos	% GFP-positive cells expressing cFos
Vehicle (n=5)	78.2±10.5	6.0±2.1	1.0±0.4	1.5±0.7
Ghrelin (n=4)	106.0±9.5	35.7±11.4*	14.8±5.8	13.9±4.9
BIM-28131 (n=4)	84.5±9.4	43.5±7.6**	18.0±4.9*	20.7±3.9**
BIM-28163 (n=4)	102.5±14.9	24.2±7.5	11.5±4.1	11.9±3.7
Ghrelin + BIM-28163 (n=4)	81.2±23.1	30.2±8.6*	16.0±7.7*	23.4±7.5**

*P<0.05 and **P<0.01 vs vehicle

Table 3. Summary of the effects of the different BIM compounds on GH secretion, food intake and cFos activity in the ArcN, NTS and AP after intraperitoneal administration in the mouse. Food intake and cFos were measured 90 minutes and GH 15 minutes post-injection.

	Food intake	GH secretion	c-fos ArcN	c-fos AP	c-fos NTS	c-fos VMH
Ghrelin	+/-	+++	++	+++	+++	=
28131	+++	+++	+++	+++	+++	=
28163	++	=	+ /-	+ /-	+++	=
Ghrelin+ 28163	No antagonistic action	Antagonistic action	No antagonistic action	No antagonistic action	No antagonistic action	=

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Nous avons étudié les impacts de l'antagoniste synthétique du GHS-R1a, le BIM28163 et de l'agoniste le BIM28131 sur la sécrétion de GH (Figure 18) et la prise alimentaire (Figure 19) chez des souris *ghrl*^{-/-} et les avons comparés aux effets de l'obestatine, peptide naturel ayant des actions antagonistes sur les actions de la ghréline pour ces deux mêmes paramètres (Figure 20 et 21).

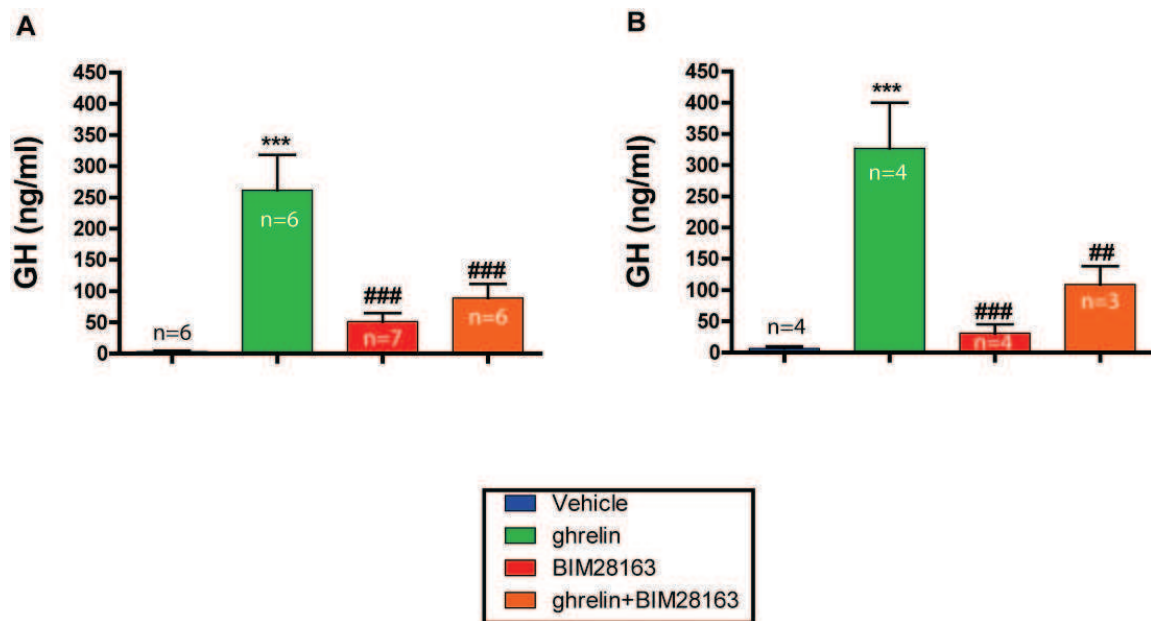


Figure 22 : Sécrétion de GH suite à l'administration du composé BIM28163 et de la ghréline chez des souris *ghrl*^{+/+} (A) et *ghrl*^{-/-} (B).

***: $p < 0,001$ vs vehicle group, ## : $p < 0,01$ vs ghrelin group, ### : $p < 0,001$ vs ghrelin group.

Le BIM28163 n'a pas d'effet propre sur la sécrétion de GH mais inhibe significativement la sécrétion de GH induite par la ghréline que ce soit chez les souris *ghrl*^{-/-} ou *+/+*.

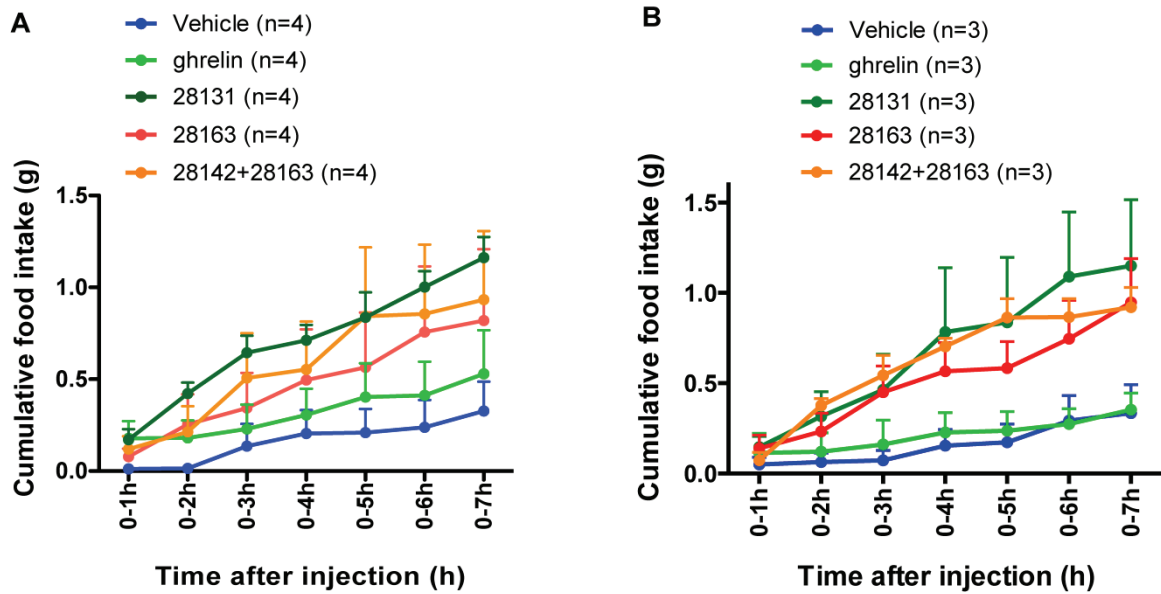


Figure 23 : Prise alimentaire cumulée suite à l'administration des composés BIM et de la ghréline chez des *ghrl*^{+/+} (A) et *ghrl*^{-/-} (B).

L'administration de ghréline ne stimule pas significativement la prise alimentaire chez ces souris quelque soit leur génotype, une grand variabilité est observé dans ce groupe. Le BIM28131 stimule significativement la prise alimentaire aussi bien chez les souris *ghrl*^{+/+} que *ghrl*^{-/-}. Chez les souris *ghrl*^{+/+} la co-administration de la ghréline et de l'agoniste BIM28163 entraîne une augmentation de la prise alimentaire qui est également visible chez les souris *ghrl*^{-/-}. Enfin le BIM28163 seul à tendance à stimuler la prise alimentaire chez les souris *ghrl*^{+/+} alors que ce résultat est significatif chez les souris *ghrl*^{-/-}.

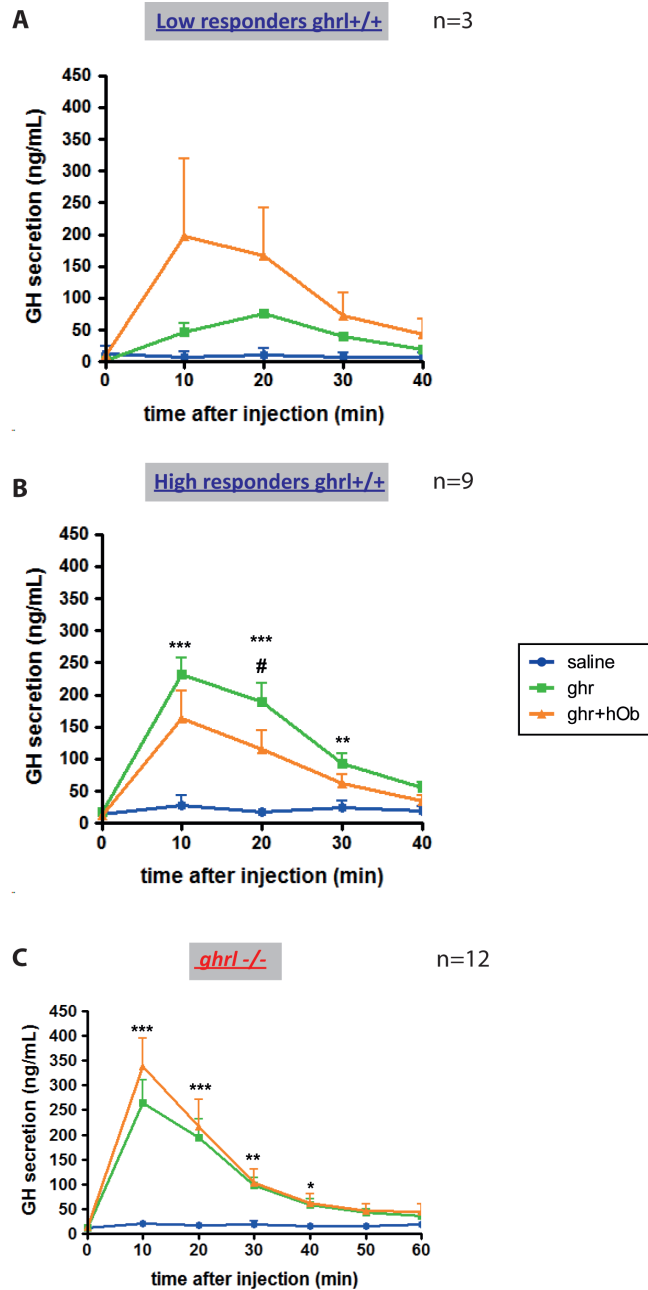


Figure 24 : Sécrétion de GH suite à l'administration de ghréline (ghr) ou à la co-administration de ghréline et obestatine (ghr+hOb) chez les souris low responders ghrl+/+ (A), chez les souris high responders ghr+/+ (B) et chez les souris ghrl-/- (C). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs saline , # : $p < 0,05$ vs ghrelin

Chez les souris ghrl+/+, la ghréline ne stimule pas toujours la sécrétion de GH comme montré précédemment (Partie I, article 1), cependant lorsqu'un effet stimulateur est observé, il est identique à celui retrouvé chez les souris ghrl-/-. De façon intéressante, un effet stimulateur de la ghréline est observé chez l'ensemble des souris ghrl-/-. De plus, l'obestatine n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la sécrétion de GH induite par la ghréline chez les souris ghrl-/-.

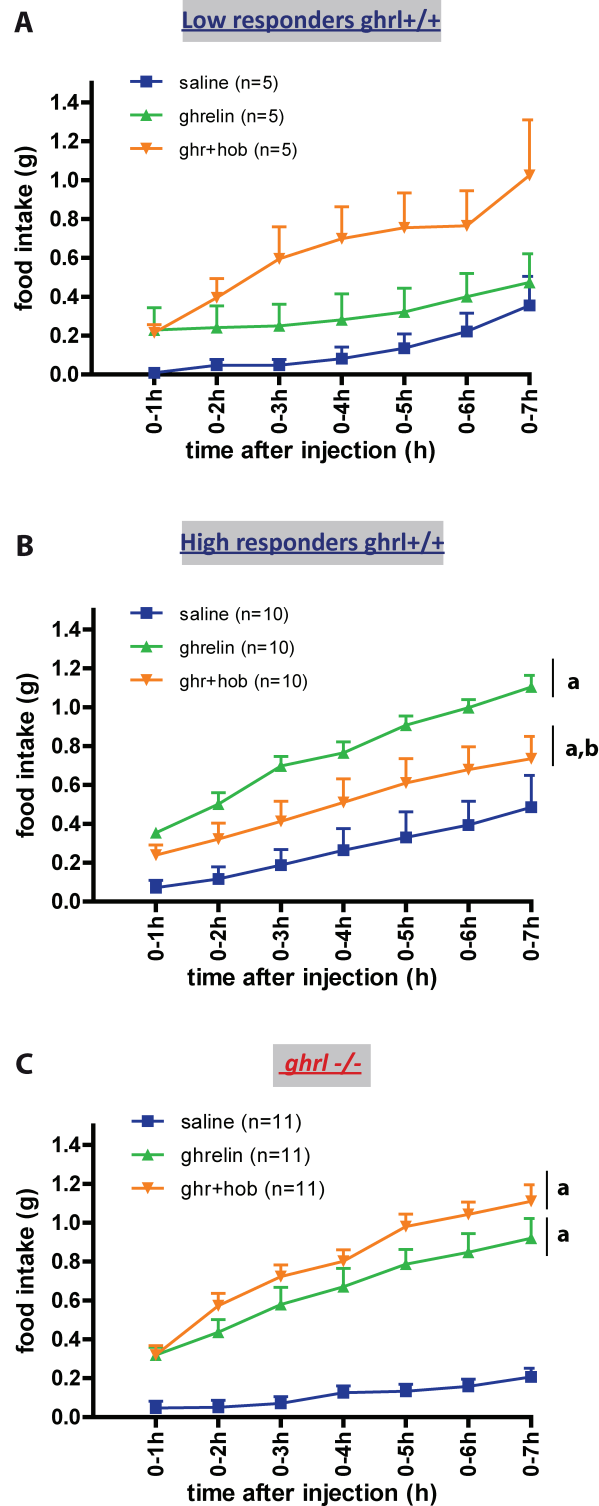


Figure 25 : Prise alimentaire cumulée suite à l'administration de ghréline (ghrelin) et de la co-administration de ghréline et d'obestatine (ghr+hOb) chez des souris low responders ghrl+/+ (A), chez les souris high responders ghr+/+ (B) et chez les souris ghrl-/- (C). a : $p < 0,05$ vs saline, b : $p < 0,05$ vs ghrelin

Comme pour la sécrétion de GH, deux types de réponses à la ghréline sont observées chez les souris *ghrl*^{+/+} en ce qui concerne la prise alimentaire. L'obestatine inhibe partiellement la prise alimentaire induite par la ghréline uniquement chez les souris *ghrl*^{+/+} qui répondent à la ghréline. De plus, l'obestatine n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la prise alimentaire induite par la ghréline chez les souris *ghrl*^{-/-}. Ainsi, l'obestatine ne présente pas le même effet chez les *ghrl*^{+/+} high responders comparées aux souris *ghrl*^{-/-} qui répondent aussi bien à la ghréline.

RESULTATS NOTABLES

Chez les souris sauvages, alors que l'administration de l'antagoniste BIM28163 n'a aucun effet sur la sécrétion de GH, elle induit l'augmentation de la prise alimentaire et de l'activation neuronale au niveau de plusieurs régions du système nerveux central notamment le VMH et le NTS. L'effet antagoniste du BIM28163 sur les effets de la ghréline est uniquement visible en ce qui concerne la sécrétion de GH.

Le BIM28131, stimule la sécrétion de GH de la même manière que la ghréline mais semble avoir une action plus prononcée pour induire la prise alimentaire. Le BIM28131 comme la ghréline stimule l'activation neuronale au niveau du noyau ARC et notamment au niveau de la sous population des neurones à NPY, où ce peptide active un plus grand nombre de neurones que la ghréline.

Le nombre de souris administrées avec la ghréline n'est pas suffisant pour pouvoir les séparer en high et low responders cependant une forte variabilité est présente au sein du groupe.

Chez les souris ghrl^{-/-}, l'administration de BIM28163 induit la prise alimentaire, même en l'absence du ligand endogène du GHS-R1a, confirmant l'effet agoniste de ce peptide en ce qui concerne la prise alimentaire alors qu'il n'a aucun effet sur la sécrétion de GH. Le BIM28131 induit quant à lui la prise alimentaire de façon plus importante en comparaison avec la ghréline.

L'obestatine qui inhibe partiellement la prise alimentaire et la sécrétion de GH induite par la ghréline chez les souris sauvages (ghrl^{+/+}) n'agit pas chez les souris ghrl^{-/-}. Cette absence d'effet de la co-administration de ghréline et obestatine chez la souris ghrl^{-/-} est comparable à celui retrouvé chez la souris ghrl^{+/+} low responder. Le groupe de souris ghrl^{-/-} ayant reçu l'administration de ghréline comporte moins de variabilité que le groupe de souris ghrl^{+/+} ayant reçu le même traitement et ne peut être divisé en high et low responders.

Ces résultats confirment la dichotomie existante entre les voies par lesquelles le système ghréline/GHS-R1a stimule la sécrétion de GH et la prise alimentaire. De plus, la réponse du système ghréline/GHS-R1a semble être différente peut-être à cause d'un paramètre physiologique qui reste à déterminer.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse ont permis de montrer pour la première fois des réponses différentes à l'administration de ghréline d'une souris à l'autre concernant la sécrétion de GH et la prise alimentaire. Deux catégories de souris ont ainsi été mises en évidence : les « high responders » chez lesquelles la ghréline stimule de façon significative la sécrétion de GH et la prise alimentaire et les « low responders » chez lesquelles la ghréline a un effet plus modéré sur ces deux paramètres. Du fait de la variabilité de réponse à la ghréline, l'action inhibitrice de l'obestatine sur les effets de la ghréline n'est visible que chez les souris high responders. Ces données pourraient expliquer la difficulté pour caractériser les effets de l'obestatine jusqu'à ce jour.

Dans la même étude nous montrons que l'obestatine et un variant naturel de ce peptide (Q90L) interagissent avec la ghréline aux niveaux de deux régions neuronales clés dans la régulation de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire : le noyau arqué (et notamment au niveau des neurones à GHRH et NPY) et le noyau du tractus solitaire.

Chez les souris déficientes pour la préproghréline (*ghrl*^{-/-}), la ghréline stimule la sécrétion de GH et la prise alimentaire chez l'ensemble des souris de la même manière que chez les souris sauvages « high responders » et de façon paradoxale l'obestatine n'inhibe pas ses effets. Par contre nous montrons que des analogues synthétiques de la ghréline, agoniste et antagoniste du GHSR, ont le même effet sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire que ce soit chez les souris sauvages ou *ghrl*^{-/-}. Ce dernier résultat conforte l'hypothèse selon laquelle ce modèle de souris, déficient pour l'ensemble des peptides dérivés de la préproghréline, maintient une signalisation GHS-R intacte et se révèle être un bon modèle pour des études pharmacologiques impliquant les ligands du GHS-R.

Enfin, grâce au développement récent d'une méthode de prélèvements sanguins répétés chez la souris associée à un dosage immunoenzymatique très sensible nous montrons pour la première fois une diminution transitoire de l'amplitude des pics sécrétoires de GH chez les souris *ghrl*^{-/-} âgées de 7 semaines comparées aux souris sauvages qui s'accompagne d'une modification de l'expression de GHRH hypothalamique. Ces résultats suggèrent un impact prépondérant de l'invalidation de la ghréline pendant la période de croissance et confirment d'autres données sur le rôle de ce peptide principalement au cours du développement post-natal.

1. L'obestatine une hormone controversée

Au cours de cette thèse, les effets inhibiteurs de l'obestatine sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire induits par la ghréline ont été démontrés en ce qui concerne la sécrétion de GH et confirmés en ce qui concerne la prise alimentaire chez la souris (Zizzari et al 2007). Cependant les effets *per se* de l'obestatine sont toujours sujets à controverse et sur un total de 20 études seulement 5 ont réussi à reproduire l'action anorexigène de ce peptide (Annemie et al 2009). En parallèle de notre étude concernant l'impact de l'obestatine sur l'action orexigène de la ghréline, nous avons également mesuré l'effet de l'obestatine seule sur ce paramètre (Figure 26). Comme la plupart des études précédemment citées nous n'avons pas observé d'effet anorexigène propre de l'obestatine dans des conditions de prise alimentaire standard que ce soit chez les souris sauvages (ghrl+/+) ou déficientes en ghréline (ghrl-/-).

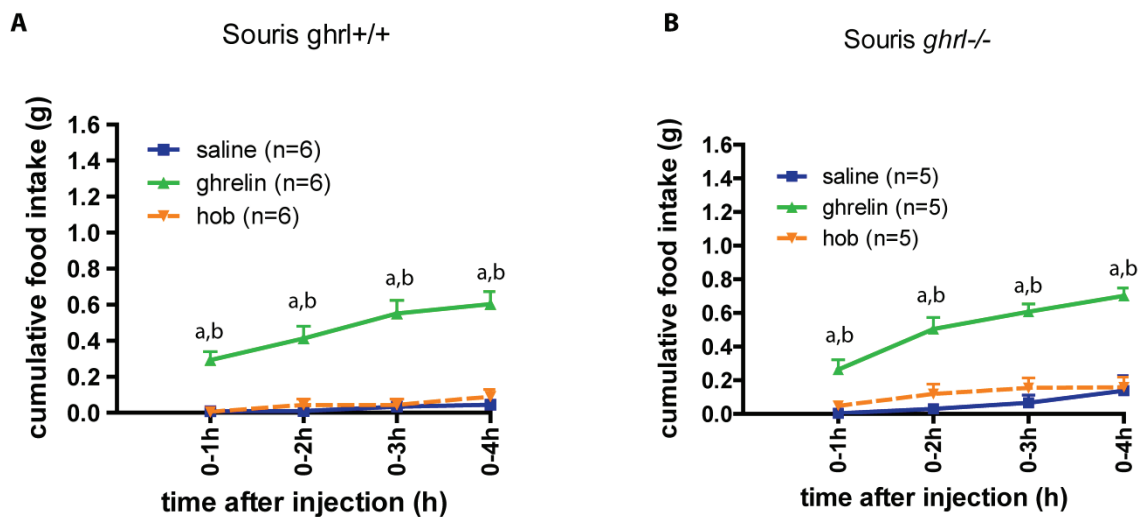


Figure 26 : Prise alimentaire cumulée après administration de ghréline ou d'obestatine seule chez les souris ghrl+/+ (A) ou ghrl-/- (B).

a : $p < 0,05$ vs saline et b : $p < 0,05$ vs obestatine (hob)

Bien que l'obestatine n'ait pas d'impact sur la prise alimentaire, ses effets pharmacologiques inhibiteurs de l'action de la ghréline sont clairs chez les souris ghrl+/+.

Ainsi nous avons montré pour la première fois dans notre étude que l'interaction entre ghréline et obestatine, pour le contrôle de la sécrétion de GH et du comportement alimentaire, a lieu au niveau de populations neuronales clés dans la régulation de ces deux paramètres physiologiques : les neurones à NPY et GHRH. Des différences de résultats ont été observées concernant l'activation neuronale selon la technique utilisée, immunohistochimie ou électrophysiologie, au niveau des neurones à GHRH. Ainsi, l'étude de l'activité des neurones à NPY par la technique d'électrophysiologie semble nécessaire afin de conforter nos résultats obtenus par immunohistochimie au niveau cette sous population neuronale. De plus, il serait intéressant de voir si le changement éventuel de l'activité de ces neurones se traduit ou non par la modification de la libération de NPY et/ou d'AgRP. Cette étude a été réalisée en ce qui concerne la libération de GHRH par des explants hypothalamiques et il a été montré que l'inhibition de la part de l'obestatine de l'activité des neurones à GHRH induite par la ghréline se reflétait par une diminution de la libération de GHRH (Feng et al 2011).

Il sera également important de vérifier si l'interaction entre la ghréline et l'obestatine a lieu au niveau de neurones qui expriment le GHS-R. L'immunohistochimie du GHS-R1a a ainsi été testée au laboratoire, cependant, il n'existe pas à ce jour d'anticorps efficace pour cette technique. Très récemment des souris GHS-R1a GFP ont été développées (projet GENSAT, Rockefeller University). L'utilisation de ces souris serait compatible avec la technique d'immunohistochimie pour l'étude de l'activation neuronale à la suite de co-administration de ghréline et d'obestatine.

Enfin, l'interaction entre ghréline et obestatine pourrait avoir lieu au niveau d'autres sous-populations neuronales que celles que l'on a observées. Ainsi, d'autres populations neuronales intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire (comme les neurones à orexine, POMC ou encore 26RFA) et/ou la sécrétion de GH (comme les neurones à somatostatine) pourraient être étudiées.

Il a été récemment montré que la liaison de la ghréline à son récepteur le GHS-R1a au niveau des neurones à NPY/AgRP de l'hypothalamus induisait une cascade de signalisation dont l'AMPK faisait partie et amenant à l'activation de la protéine découplante mitochondriale UCP2 (Andrews et al 2008, Kohno et al 2008). Ainsi à la vue de nos résultats,

il serait intéressant d'étudier les mécanismes intracellulaires par lesquelles l'obestatine exerce son effet inhibiteur sur l'action de la ghréline au niveau des neurones à NPY, notamment en regardant si la cascade de signalisation liée à l'AMPK est impactée.

Il est néanmoins intéressant de noter que l'effet inhibiteur de l'obestatine sur la prise alimentaire induite par la ghréline n'est visible qu'une heure après la co-administration des deux peptides. Ceci pourrait être la conséquence d'une action inhibitrice indirecte de l'obestatine ou bien encore d'un passage plus difficile de la barrière hématoencéphalique. Une étude avait ainsi montré un passage plus facile de la ghréline acylée depuis le système nerveux central vers la périphérie que l'inverse (Banks 2002). Cependant le délai dans l'action inhibitrice de l'obestatine que nous observons n'est pas retrouvé dans une autre étude du laboratoire (Zizzari et al 2007) et pour laquelle la co-administration de ghréline et d'obestatine avait été effectuée au moment de la transition jour/nuit, moment où l'on observe un pic de sécrétion de ghréline acylée (Zizzari et al 2011) et peut-être donc plus favorable à une action inhibitrice rapide de l'obestatine.

Chez les souris *ghrl*^{-/-} l'obestatine n'antagonise pas les effets de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire contrairement à ce qui est observé chez les souris *ghrl*^{+/+}. L'origine de cette différence reste à déterminer. Des compensations mises en place chez les souris *ghrl*^{-/-} et visant à favoriser la prise alimentaire pouvant masquer l'action inhibitrice de l'obestatine. Ainsi il serait intéressant d'explorer les effets de l'obestatine sur la prise alimentaire dans un environnement dans lequel le signal orexigène de la ghréline est quasi absent. Les souris dépourvues en neurones à NPY/AgRP (Luquet et al 2005), cibles principales de la ghréline en ce qui concerne le comportement alimentaire (Kohno et al 2003, Shintani et al 2001), semblent ainsi être un modèle de choix. Des données préliminaires obtenues en collaboration avec Serge Luquet et Raphaël Denis montrent que l'administration d'obestatine chez les souris délétées de leurs neurones NPY/AgRP en période néonatale provoque une diminution de la prise alimentaire par rapport à l'administration d'une solution saline. Ces données sont à confirmer et l'étude de l'effet du variant Q90L de l'obestatine sur la prise alimentaire chez ces souris serait également intéressante. Les souris déficientes pour un des récepteurs aux endocannabinoïdes, *CB1*^{-/-}, constituent un autre modèle de souris chez lequel la ghréline n'exerce pas d'effet orexigène

(Kola et al 2008). Il a été démontré chez ces souris qu'un signal cannabinoïde intacte était nécessaire pour les effets stimulateur de la ghréline sur la prise alimentaire via l'AMPK et inhibiteur sur les neurones anorexigènes du paraventriculaire. Il serait ainsi intéressant d'observer l'effet de l'administration d'obestatine chez ces souris.

2. Impacts des polymorphismes de la préproghréline

Plusieurs polymorphismes (SNP) du gène de la préproghréline ont été décrits dans des pathologies humaines liées à des déséquilibres de la balance énergétique et/ou de la sécrétion de GH telles que l'anorexie nerveuse ou l'obésité (Ando et al 2006, Korbonits et al 2002, Ukkola et al 2002).

Au cours de l'une de nos études, nous nous sommes intéressés à l'un de ces polymorphismes situé dans la partie codant pour l'obestatine et retrouvé chez les patientes anorexiques ayant un indice de masse corporelle minimum le plus bas (Dardennes et al 2007). Nous avons émis l'hypothèse suivant laquelle la fonction de l'obestatine pouvait être impactée par ce SNP. Nos résultats montrent que l'obestatine portant le polymorphisme Q90L conserve sa capacité à inhiber les effets de la ghréline sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH. Sur certains paramètres comme l'activation neuronale au niveau des neurones à NPY ou en électrophysiologie sur les neurones à GHRH ce variant semble même avoir une action inhibitrice plus importante que l'obestatine native. Ce dernier résultat semble être en accord avec les données physiopathologiques montrant que la présence de ce polymorphisme chez les patientes atteintes d'anorexie mentale ayant les IMC les plus bas (Dardennes et al 2007). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer la différence d'action observée entre l'obestatine native et Q90L : 1) l'obestatine Q90L pourrait avoir une stabilité dans les milieux biologiques plus importantes que l'obestatine native. Il serait ainsi intéressant de mesurer la demi-vie de l'obestatine Q90L pour la comparer à celle de l'obestatine native. 2) La substitution d'un acide aminé par un autre pourrait également modifier la conformation de l'obestatine et peut-être faciliter le passage au niveau de la barrière hématoencéphalique ou encore la liaison à un récepteur. En l'absence de récepteur identifié pour l'obestatine, les explorations de son action resteront cependant limitées.

L'étude du polymorphisme le plus fréquent du gène de la préproghréline, Leu72Met, ne peut se faire *in vivo* puisque ce dernier se trouve entre les deux séquences codantes de la ghréline et de l'obestatine (Figure 15). Ce polymorphisme pourrait avoir un impact sur la transcription et/ou la traduction des deux peptides dérivés de la préproghréline. L'étude de ce polymorphisme est d'autant plus intéressante que les porteurs de ce dernier ont une prévalence plus importante de développer un syndrome métabolique (Steinle 2005) et une obésité précoce (Korbonits et al 2002, Ukkola et al 2002). Une approche *in vitro* de l'étude de la transcription et de la traduction de la ghréline et de l'obestatine à partir du précurseur portant le polymorphisme L72M peut être mise en place pour déterminer l'impact de ce polymorphisme.

Le troisième polymorphisme du gène de la préproghréline, Arg51Gln, se trouve dans la séquence codant pour la ghréline mais est très peu fréquent au sein de la population générale (Figure 15). Son étude serait pourtant intéressante puisque ce variant est associé à un indice de masse corporelle plus bas au sein d'une population de patients atteints d'obésité (Ukkola et al 2001). Une approche *in vivo* comme celle utilisée pour l'étude du variant Q90L de l'obestatine pourrait être adoptée.

3. Les réponses différentielles à l'administration de ghréline

De façon intéressante nos études ont révélé, chez les souris sauvages, que l'administration de ghréline ne conduit pas toujours au même type de réponse. Plus précisément, chez certaines souris (low responders) la ghréline n'induit pas la prise alimentaire et la sécrétion de GH de manière significative. Chez ces souris low responders, aucun effet inhibiteur de l'obestatine ne peut être observé. Ce dernier résultat pourrait être à l'origine de l'absence d'effet antagoniste de l'obestatine sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH induites par la ghréline rapporté par plusieurs publications (Annemie et al 2009). L'origine de cette différence de réponse à la ghréline exogène reste à déterminer. De façon intéressante, chez les souris ghrl-/- toutes les souris répondent à l'administration de ghréline en augmentant significativement leur prise alimentaire et leur sécrétion de GH. Ainsi nous pouvons formuler plusieurs hypothèses pour justifier la variabilité de réponse observée chez les souris sauvages.

1) La concentration en ghréline endogène chez les souris ghrl+/+ pourrait influencer sur la réponse à la ghréline exogène ; puisque toutes les souris déficientes en ghréline sont sensibles à la ghréline exogène, les souris ghrl+/+ avec un taux en ghréline endogène bas seraient plus susceptibles de bien répondre à la ghréline exogène ?

2) Le statut nutritionnel des souris pourrait également avoir un impact sur la réponse des souris à la ghréline exogène. En effet, les souris répondent mieux à la ghréline lorsqu'elles ont subi un jeûne (Hewson and Dickson 2000). Dans notre protocole, l'administration de ghréline et la mesure de la prise alimentaire ont été effectuées en début de période diurne, période durant laquelle les souris sont normalement peu actives. Cependant nous n'avons commencé l'enregistrement du suivi de la prise alimentaire que quelques minutes avant l'administration de ghréline (Figure 27) et ne pouvons totalement exclure que le statut nutritionnel des souris affecte la réponse à cette administration.

3) Il est reconnu que le stress a un impact aussi bien sur la prise alimentaire que sur la sécrétion de GH, aussi il se pourrait que le stress influe également sur la réponse à la ghréline exogène. Une mesure de la corticostérone avant et après l'administration de ghréline pourrait être réalisée afin de répondre à cette question.

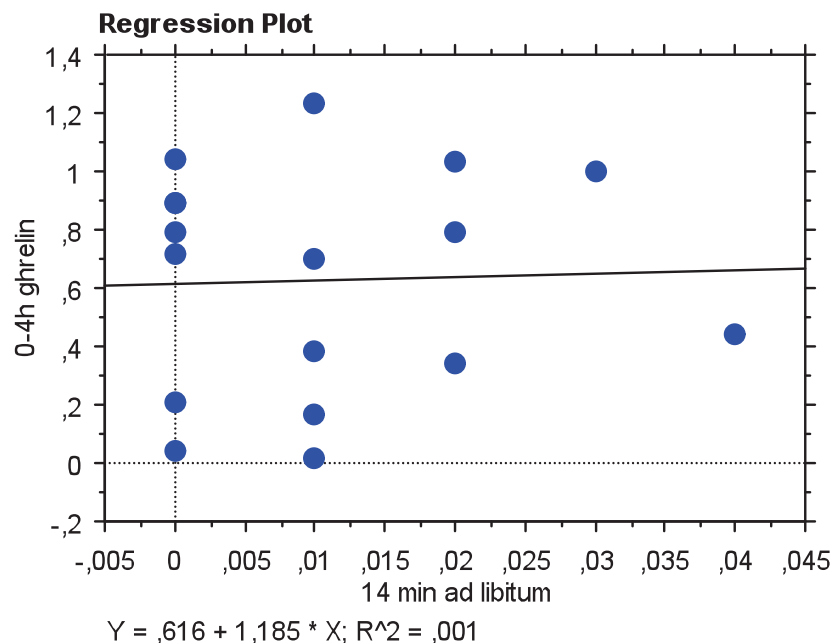


Figure 27 : Analyse de corrélation entre la prise alimentaire 14 minutes avant l'injection de ghréline et la réponse à la ghréline.

4. Rôle de la balance ghréline/obestatine dans le comportement alimentaire et la sécrétion de GH

Chez l'homme un dérèglement de la balance ghréline/obestatine a été observé au cours de plusieurs pathologies associées à un déséquilibre de la balance énergétique et/ou de la sécrétion de GH (Figure 28).

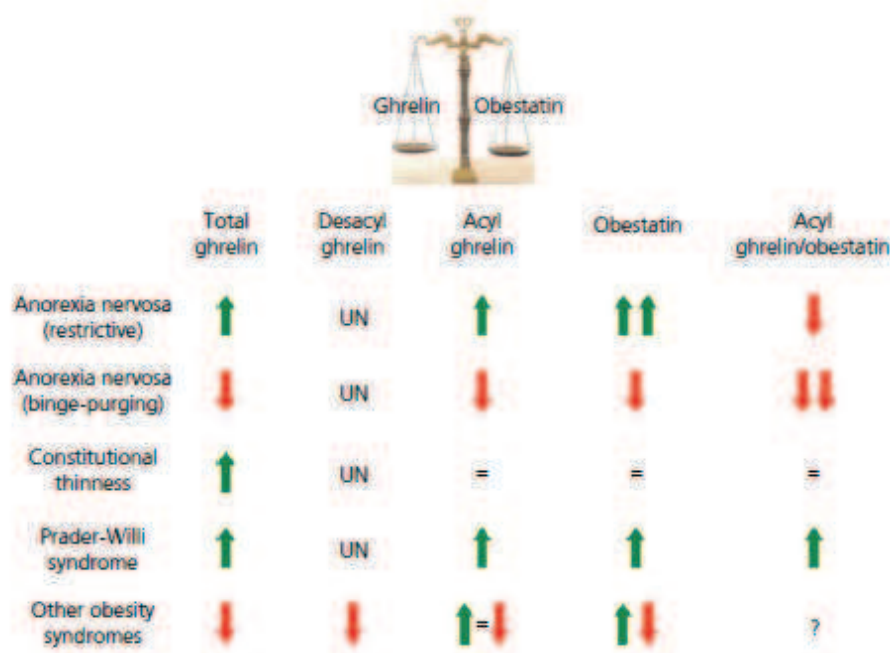


Figure 28 : Impact de la nutrition sur la balance ghréline/obestatine chez l'homme.

Le ratio ghréline/obestatine a été mesuré chez des patients atteints de différentes pathologies associées à un déséquilibre de la balance énergétique telles que l'anorexie mentale et l'obésité. UN : indéterminé. (Hassouna et al 2010)

Chez le rat, un ratio équimolaire de ghréline/obestatine a été retrouvé dans des conditions physiologiques (Zizzari et al 2007). Nous avons donc pris le parti d'étudier l'impact de ce ratio équimolaire entre ces deux peptides sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire chez des souris sauvages dans un premier temps puis chez des souris *ghrl*^{-/-}. Les souris *ghrl*^{-/-} répondent à l'administration de ghréline en augmentant leur prise alimentaire et leur sécrétion de GH mais de manière surprenante l'administration d'obestatine en quantité équimolaire avec la ghréline ne conduit pas à l'inhibition des effets de la ghréline comme observé chez les souris *ghrl*^{+/+} et comme discuté précédemment dans le chapitre 1.

Ainsi l'administration de ratios déséquilibrés en ghréline/obestatine et la comparaison des effets chez les souris ghrl+/+ et -/- pourraient également apporter plus de réponses en ce qui concerne le mode d'action de l'obestatine.

5. Rôle de la ghréline dans la pulsatilité de sécrétion de GH

Lors de cette thèse, un nouveau modèle de souris déficientes pour le gène de la préproghréline (ghrl-/-) a été développé en collaboration avec l'IGBMC par Catherine Tomasetto et backcrossées plus de 10 fois sur le fond génétique C57BL/6J. Différents modèles de souris ghrl-/- ont déjà été développés précédemment (De Smet 2005, Sun et al 2003, Wortley et al 2004) et le phénotype de ces souris était plutôt décevant au regard des actions qu'exerce ce peptide. En effet, les souris ghrl-/- adultes ne présentent aucune différence en ce qui concerne leur prise alimentaire, leur poids, leur taille ou encore leur régulation de l'homéostasie énergétique. Les souris ghrl-/- que nous avons caractérisées confirment l'ensemble de ces résultats. Cependant, la sécrétion de GH chez ces souris ghrl-/- n'avait pas été explorée et ainsi le rôle de la ghréline endogène dans la régulation de la sécrétion de GH méconnu. L'exploration de la sécrétion pulsatile de GH chez la souris était jusqu'à présent difficile du fait du petit volume de sang pouvant être prélevé. Le développement d'une technique de prélèvement de petits volumes sanguins à la queue des souris associée à un dosage immuno enzymatique de GH sur ces petits volumes de sang total nous ont permis d'effectuer l'étude présentée dans la deuxième partie des résultats (Steyn et al 2011). Nous avons donc étudié l'axe GH-IGF-1 chez ces souris et nos observations suggèrent un rôle transitoire de la ghréline dans la régulation de l'amplitude des pics sécrétoires de GH. Ce résultat concorde avec un résultat précédent du laboratoire, obtenu chez le rat après administration de ghréline exogène et d'un antagoniste spécifique du GHSR, le BIM28163 (Zizzari et al 2005). Après la co-administration de ghréline et de l'antagoniste BIM28163, la pulsatilité, le nombre de pics ou encore les valeurs basales de GH ne sont pas affectées alors que l'amplitude des pics sécrétoires est significativement réduite comme nous l'observons chez les souris ghrl-/- âgées de 7 semaines.

Le rétablissement de l'amplitude des pics à 36 semaines chez les souris ghrl-/- suggère que la ghréline joue un rôle modulateur lors du développement dans la régulation de la

sécrétion de GH mais que ce rôle est moins important une fois à l'âge adulte. Ce rôle de la ghréline chez les souris jeunes adultes est également suggéré par d'autres études effectuées chez des souris *ghrl*^{-/-} (Wortley et al 2005) ou déficientes pour le récepteur de la ghréline acylée, le GHS-R1a (*ghsr*^{-/-}) (Zigman et al 2005). Ainsi les souris *ghrl*^{-/-} ou *ghsr*^{-/-} soumises à un régime riche en graisse après leur sevrage ou très peu de temps après le sevrage (3 semaines) présentent une résistance à l'obésité induite par ce type de régime (Table 3), alors que d'autres études n'ont pas réussi à reproduire ce résultat avec un régime débutant chez des souris adultes plus âgées (Longo et al 2008, Sun et al 2003, Sun et al 2007). Plusieurs raisons concernant ces différences de résultats peuvent être avancées et seront détaillées dans le chapitre suivant (chapitre 6).

La diminution de la sécrétion de GH ne semble pas avoir d'impact sur la croissance des souris *ghrl*^{-/-} qui ne présentent pas de différence de taille ni à 7 semaines ni à 36 semaines avec leur congénères *ghrl*^{+/+}. Cependant, nous ne pouvons écarter l'éventualité d'un impact sur d'autres fonctions de la GH comme le métabolisme énergétique et notamment des lipides. Les mesures de la glycémie à jeun ainsi que de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez ces souris seraient à prévoir.

D'autre part, l'origine de la baisse de la sécrétion de GH chez les souris *ghrl*^{-/-} n'est pas encore déterminée. Néanmoins nos résultats nous permettent d'affirmer que ce déficit en GH ne provient pas de la diminution des contenus hypophysaires de GH. De manière intéressante, nous observons une augmentation de l'expression de GHRH hypothalamique chez les souris *ghrl*^{-/-} comparées aux *ghrl*^{+/+}. Ainsi, deux hypothèses restent à être testées :

- 1) Existe t-il un défaut de libération de GHRH hypothalamique ?
- 2) Existe t-il un défaut de libération de GH au niveau hypophysaire ? et l'expression du récepteur à la GHRH au niveau hypophysaire est-elle identique à celle des souris *ghrl*^{+/+} ?

Concernant les souris hétérozygotes pour le gène de la préproghréline (*ghrl*^{+/-}), elles semblent identiques aux souris sauvages en ce qui concerne la croissance staturo-pondérale, la sécrétion pulsatile de GH, ou encore les contenus hypophysaires en GH bien que la concentration plasmatique de ghréline acylée soit divisée par deux à l'âge de 12 semaines. Les concentrations en ghréline non acylée inchangée chez les souris *ghrl*^{+/-} comparée aux souris sauvages pourraient suggérer que les processus d'acylation ou de dés-acylation de la

ghréline sont impactés. Les mesures de l'activité et de l'expression de la GOAT et d'APT1 pourraient ainsi être envisagées. Une caractérisation plus complète de ces souris à l'âge de 7 semaines est nécessaire afin de déterminer l'impact d'un taux plus bas en ghréline au cours du développement.

6. Choix des modèles de souris KO pour l'étude des rôles des peptides dérivés de la préproghréline

Notre caractérisation des souris ghrl-/- est concordante avec les résultats obtenus par les équipes ayant caractérisé d'autres modèles de souris ghrl-/- (Tableau 3). Des phénotypes particuliers ont également été décrits après un régime riche en graisse notamment lorsque les souris sont jeunes (âgées de 4 à 7 semaines). Ces résultats, comme les nôtres concernant la sécrétion de GH chez les jeunes souris, confirment que la ghréline joue un rôle important durant le développement et chez les souris jeunes adultes en ce qui concerne la régulation de l'homéostasie énergétique et la régulation de la sécrétion de GH.

Les différences de phénotypes observées après un régime riche en graisse chez les différents modèles de souris ne proviennent cependant pas uniquement de la différence d'âge des souris. Ainsi plusieurs paramètres diffèrent et peuvent être à l'origine des variabilités de phénotype observées :

- 1) Le fond génétique des souris. Les souris qui sont soumises très jeunes à un régime riche en graisse ont été développées sur un fond génétique mixte (Wortley et al 2005, Zigman et al 2005) qui serait plus favorable à la résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisse alors que les souris chez lesquelles aucune résistance à l'obésité n'est observée (que ce soit à 8 semaines ou chez les souris plus âgées) ont été développées sur un fond génétique C57BL/6.
- 2) La composition des régimes riches en graisses. Les pourcentages de lipides présents dans la nourriture servant aux régimes riches en graisses varient de 40% à 60%, la nature des lipides qui composent ces nourritures varient également en fonction des études et pourrait avoir un impact sur l'homéostasie énergétique et la prise de poids (Kirchner et al 2009, Sun et al 2007).

La caractérisation des souris *ghrl*^{-/-} permet l'étude des rôles des peptides dérivés de la préproghréline mais sans distinction des rôles de chacun. Ainsi afin de conforter nos résultats concernant la régulation de la sécrétion de GH et pour plus précisément définir le rôle de la ghreline acylée, des mesures de la pulsativité de sécrétion de GH chez des souris déficientes en GHS-R1a (*ghsr*^{-/-}) ou en GOAT (*goat*^{-/-}) seraient à envisager.

De même, notre étude concernant les effets d'agonistes et antagonistes du GHS-R1a nous permet d'affirmer que les neurones à NPY sont les cibles de ces composés mais ne nous permet pas de déterminer si le GHS-R1a est le récepteur de ces composés au niveau de cette sous population neuronale. Les mêmes protocoles expérimentaux concernant la prise alimentaire, la sécrétion de GH et l'activation neuronale appliqués aux souris *ghsr*^{-/-} nous permettraient de trancher sur la question. Un autre composé développé en tant qu'antagoniste du GHS-R1a, s'est révélé stimuler la prise alimentaire par le biais de ce même récepteur puisque son action est abolie chez les souris *ghsr*^{-/-} (Costantini et al 2011). Ainsi le BIM28163 pourrait aussi bien stimuler la prise alimentaire par le biais d'un récepteur encore inconnu que par le biais du GHS-R1a et antagoniser la sécrétion de GH induite par la ghreline par une voie de signalisation qui est différente (Carreira et al 2004 , Holst et al 2005).

Une étude très récente a de plus montré la possibilité de dimérisation du GHS-R1a avec le récepteur DRD2 (Kern et al 2012). Ce résultat ouvre de nouvelles approches concernant la signalisation du GHS-R1a, le ligand endogène de ce récepteur n'étant dans certains cas pas indispensable pour stimuler les voies de signalisations liées à ce récepteur.

La construction de souris invalidées de manière conditionnelle pour le gène de la préproghréline est possible au sein du laboratoire. Les souris KO inducible devront être croisées avec les lignées *cre* appropriées afin de restreindre la délétion du gène à un type cellulaire particulier (Nagy 2000) comme les cellules entéroendocrines qui sont le siège principal de synthèse de ghreline, ou le système nerveux central (Neurogenin3-Cre ou Nestin-Cre) ou à un stade particulier du développement (CMV-Cre-ER(T)). L'invalidation du gène de la préproghréline au moment de différents stades clés du développement et de la croissance pourrait nous apporter plus de précision sur le rôle de la préproghréline au cours de la vie notamment concernant son rôle dans la mise en place et la régulation des circuits contrôlant la prise alimentaire et la sécrétion de GH. Nous pourrions étudier également

l'impact de différents ratios ghréline/obestatine chez ces souris invalidées de manière conditionnelle pour le gène de la préproghréline.

Le modèle de souris préproghréline que nous avons étudié ne synthétise pas de ghréline et les dosages de l'obestatine nous indiquent l'absence de ce peptide dans la circulation de ces souris (Figure 20). Cependant pour nous assurer de l'identité exacte du peptide que l'on dose, une étude associant les dosages immunoenzymatiques à l'HPLC et la spectrométrie de masse est actuellement en cours au sein du laboratoire.

Dans leur ensemble, nos résultats contribuent à la compréhension du mécanisme d'interaction et de modulation de la ghréline et de l'obestatine et leur impact sur le comportement alimentaire et la sécrétion de GH. La ghréline et l'obestatine pourraient ainsi être des cibles potentielles pour le traitement des pathologies associées à un déséquilibre de la balance énergétique, des traitements avec différentes combinaisons de ghréline et d'obestatine pourraient être envisagés. Ces données pourraient donc permettre des avancées cliniques dans le domaine de l'obésité humaine et des troubles du comportement alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA *et al* (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* **142**: 3457-3463.

Abe H, Kato Y, Iwasaki Y, CHIHARA K, Imura H (1978). Central effect of somatostatin on the secretion of growth hormone in the anesthetized rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. pp 346-349.

Abe H, Molitch ME, Van Wyk JJ, Underwood LE (1983). Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology*. pp 1319-1324.

Abizaid A, Liu Z-W, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD *et al* (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* pp 3229-3239.

Abrams RL, Grumbach MM, Kaplan SL (1971). The effect of administration of human growth hormone on the plasma growth hormone, cortisol, glucose, and free fatty acid response to insulin: evidence for growth hormone autoregulation in man. *J. Clin. Invest.* pp 940-950.

Adams EF, Venetikonou MS, Woods CA, Lacoumenta S, Burrin JM (1987). Neuropeptide Y directly inhibits growth hormone secretion by human pituitary somatotrophic tumours. *Acta Endocrinol (Copenh)*. pp 149-154.

Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD *et al* (1998). Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 638-642.

Adams SH, Won WB, Schonhoff SE, Leiter AB, Paterniti JRJ (2004). Effects of peptide YY[3-36] on short-term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels. *Endocrinology*. pp 4967-4975.

Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. pp 1070-1077.

Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A *et al* (2004). Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur. J. Endocrinol.* pp 447-455.

Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y *et al* (2005). Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 6-9.

Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR *et al* (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*. pp 877-879.

Anand BK, CHHINA GS, SHARMA KN, DUA S, SINGH B (1964). ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am. J. Physiol.* pp 1146-1154.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR *et al* (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*. pp 12005-12008.

- Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA *et al* (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* **142**: 3457-3463.
- Abe H, Kato Y, Iwasaki Y, CHIHARA K, Imura H (1978). Central effect of somatostatin on the secretion of growth hormone in the anesthetized rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. pp 346-349.
- Abe H, Molitch ME, Van Wyk JJ, Underwood LE (1983). Human growth hormone and somatomedin C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology*. pp 1319-1324.
- Abizaid A, Liu Z-W, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD *et al* (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* pp 3229-3239.
- Abrams RL, Grumbach MM, Kaplan SL (1971). The effect of administration of human growth hormone on the plasma growth hormone, cortisol, glucose, and free fatty acid response to insulin: evidence for growth hormone autoregulation in man. *J. Clin. Invest.* pp 940-950.
- Adams EF, Venetikonou MS, Woods CA, Lacoumenta S, Burrin JM (1987). Neuropeptide Y directly inhibits growth hormone secretion by human pituitary somatotrophic tumours. *Acta Endocrinol (Copenh)*. pp 149-154.
- Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD *et al* (1998). Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 638-642.
- Adams SH, Won WB, Schonhoff SE, Leiter AB, Paterniti JRJ (2004). Effects of peptide YY[3-36] on short-term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels. *Endocrinology*. pp 4967-4975.
- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. pp 1070-1077.
- Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A *et al* (2004). Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur. J. Endocrinol.* pp 447-455.
- Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y *et al* (2005). Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 6-9.
- Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR *et al* (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*. pp 877-879.
- Anand BK, CHHINA GS, SHARMA KN, DUA S, SINGH B (1964). ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am. J. Physiol.* pp 1146-1154.
- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR *et al* (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem.* pp 12005-12008.

- Ando T, Komaki G, Naruo T, Okabe K, Takii M, Kawai K *et al* (2006). Possible role of preproghrelin gene polymorphisms in susceptibility to bulimia nervosa. *Am. J. Med. Genet.* pp 929-934.
- Andrews ZB, Liu Z-W, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM *et al* (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature.* pp 846-851.
- Annemie VD, Debby VD, Valentijn V, Bart DS, Walter L, Liliane S *et al* (2009). Central administration of obestatin fails to show inhibitory effects on food and water intake in mice. *Regulatory Peptides.* Elsevier B.V. pp 77-82.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* **14**: 351-355.
- Appleyard SM, Hayward M, Young JI, Butler AA, Cone RD, Rubinstein M *et al* (2003). A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis. *Endocrinology.* pp 1753-1760.
- Appleyard SM (2005). Proopiomelanocortin Neurons in Nucleus Tractus Solitarius Are Activated by Visceral Afferents: Regulation by Cholecystokinin and Opioids. *Journal of Neuroscience.* pp 3578-3585.
- Argente J, Chowen JA, Zeitler P, Clifton DK, Steiner RA (1991). Sexual dimorphism of growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the hypothalamus of the rat during development. *Endocrinology.* pp 2369-2375.
- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN *et al* (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell.* pp 237-244.
- Arimura A, Sato H, Dupont A, Nishi N, Schally AV (1975). Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science.* pp 1007-1009.
- Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y *et al* (2005). Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology.* pp 355-364.
- Arnold MA, Fernstrom JD (1981). L-Tryptophan injection enhances pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* pp 331-335.
- Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C *et al* (2000). Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J. Endocrinol. Invest.* pp 493-495.
- Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C *et al* (2001). Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1169-1174.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M *et al* (2001). A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology.* pp 143-147.
- Asakawa A (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut.* pp 18-24.
- Asnicar MA, Smith DP, Yang DD, Heiman ML, Fox N, Chen YF *et al* (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* **142**: 4394-4400.

- Baggio LL, Kim J-G, Drucker DJ (2004). Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. *Diabetes*. pp S205-214.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF *et al* (1985). An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Research*. pp 172-175.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**: 73-82.
- Balthasar N, Mery PF, Magoulas CB, Mathers KE, Martin A, Mollard P *et al* (2003). Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice: a ventral hypothalamic network. *Endocrinology* **144**: 2728-2740.
- Banks WA (2002). Extent and Direction of Ghrelin Transport Across the Blood-Brain Barrier Is Determined by Its Unique Primary Structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. pp 822-827.
- Baragli A, Ghe C, Arnoletti E, Granata R, Ghigo E, Muccioli G (2011). Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphodiesterase 3B. *Biochim Biophys Acta*. pp 386-396.
- Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L *et al* (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. pp E228-235.
- Barazzoni R, Zanetti M, Cattin MR, Visintin L, Vinci P, Cattin L *et al* (2007a). Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver AKT signaling in rats. *Obesity (Silver Spring)*. pp 2614-2623.
- Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M *et al* (2007b). Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3935-3940.
- Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM (1985). Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature*. pp 279-281.
- Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM (1988). Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends in Neurosciences*. pp 107-111.
- Bataille D, Blache P, Mercier F, Jarrousse C, Kervran A, Dufour M *et al* (1988). Glucagon and related peptides. Molecular structure and biological specificity. *Ann N Y Acad Sci* **527**: 168-185.
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL *et al* (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. pp 650-654.
- Batterham RL, Bloom SR (2003). The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp 162-168.
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS *et al* (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* **349**: 941-948.

- Bauer FE, Ginsberg L, Venetikon M, MacKay DJ, Burrin JM, Bloom SR (1986). Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. *Lancet*. pp 192-195.
- Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC (1986). A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 134-141.
- Baumbach WR, Horner DL, Logan JS (1989). The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev*. pp 1199-1205.
- Beaudet A, Greenspun D, Raelson J, Tannenbaum GS (1995). Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function. *NSC*. pp 551-561.
- Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS *et al* (2003). Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* **278**: 8877-8880.
- Beck B, Stricker-Krongrad A, Burlet A, Cumin F, Burlet C (2001). Plasma leptin and hypothalamic neuropeptide Y and galanin levels in Long-Evans rats with marked dietary preferences. *Nutr Neurosci*. pp 39-50.
- Bedecs K, Berthold M, Bartfai T (1995). Galanin--10 years with a neuroendocrine peptide. *Int J Biochem Cell Biol*. pp 337-349.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV *et al* (2000). Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* **43**: 4370-4376.
- Behncken SN, Billestrup N, Brown R, Amstrup J, Conway-Campbell B, Waters MJ (2000). Growth hormone (GH)-independent dimerization of GH receptor by a leucine zipper results in constitutive activation. *J Biol Chem*. pp 17000-17007.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ *et al* (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*. pp 9048-9052.
- Berelowitz M, Dudlak D, Frohman LA (1982). Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones. *J. Clin. Invest*. pp 1293-1301.
- Bertherat J, Dournaud P, Berod A, Normand E, Bloch B, Rostene W *et al* (1992). Growth hormone-releasing hormone-synthesizing neurons are a subpopulation of somatostatin receptor-labelled cells in the rat arcuate nucleus: a combined in situ hybridization and receptor light-microscopic radioautographic study. *Neuroendocrinology*. pp 25-31.
- Bertherat J, Bluet-Pajot MT, EPELBAUM J (1995). Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur. J. Endocrinol*. pp 12-24.
- Besset A, Bonardet A, Rondouin G, Descomps B, Passouant P (1982). Increase in sleep related GH and Prl secretion after chronic arginine aspartate administration in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*. pp 18-23.
- Bi S, Scott KA, Kopin AS, Moran TH (2004). Differential roles for cholecystokinin receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology*. pp 3873-3880.

- Bilezikjian LM, Vale WW (1983). Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology*. pp 1726-1731.
- Billestrup N, Swanson LW, Vale W (1986). Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 6854-6857.
- Billestrup N, Mitchell RL, Vale W, Verma IM (1987). Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Molecular Endocrinology*. pp 300-305.
- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol*. pp R321-327.
- Binn M, Albert C, Gougeon A, Maerki H, Coulie B, Lemoyne M *et al* (2006). Ghrelin gastrokinetic action in patients with neurogenic gastroparesis. *Peptides*. pp 1603-1606.
- Bivens CH, Lebovitz HE, Feldman JM (1973). Inhibition of hypoglycemia-induced growth hormone secretion by the serotonin antagonists cyproheptadine and methysergide. *N Engl J Med*. pp 236-239.
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*. pp 32686-32695.
- Blache P, Kervran A, Bataille D (1988). Oxyntomodulin and glicentin: brain-gut peptides in the rat. *Endocrinology* **123**: 2782-2787.
- Bloch B, Ling N, Benoit R, Wehrenberg WB, Guillemin R (1984). Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature*. pp 272-273.
- Blomqvist AG, Herzog H (1997). Y-receptor subtypes--how many more? *Trends in Neurosciences*. pp 294-298.
- Boockfor FR, Hoeffler JP, Frawley LS (1985). Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: thyrotropin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportions of growth hormone and prolactin secretors. *Endocrinology*. pp 418-420.
- Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* **114**: 1537-1545.
- Bowers CY, Sartor AO, Reynolds GA, Badger TM (1991). On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*. pp 2027-2035.
- Bratusch-Marrain P, Waldhauser W (1979). The influence of amino acids and somatostatin on prolactin and growth hormone release in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*. pp 403-408.
- Brazau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J *et al* (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. pp 77-79.
- Brazau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Ying SY, Guillemin R (1982). Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7909-7913.

- Bresciani E, Rapetti D, Donà F, Bulgarelli I, Tamiasso L, Locatelli V *et al* (2006). Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J. Endocrinol. Invest.* pp RC16-18.
- Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh JN, Hokfelt T (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology.* pp 393-408.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15043-15048.
- Broberger C (1999). Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* **848**: 101-113.
- Brodows RG, Pi-Sunyer FX, Campbell RG (1973). Neural control of counter-regulatory events during glucopenia in man. *J. Clin. Invest.* pp 1841-1844.
- Broglia F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M *et al* (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5083-5086.
- Broglia F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V *et al* (2004a). The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin Endocrinol.* pp 592-599.
- Broglia F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M *et al* (2004b). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 3062-3065.
- Brownstein M, Arimura A, Sato H, Schally AV, Kizer JS (1975). The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology.* pp 1456-1461.
- Bruni JF, Van Vugt D, Marshall S, Meites J (1977). Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci.* pp 461-466.
- Bruzzo F, Lectez B, Alexandre D, Jegou S, Mounien L, Tollemer H *et al* (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* pp 573-591.
- Buffa R, Solcia E, Go VL (1976). Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology.* pp 528-532.
- Burton KA, Kabigting EB, Clifton DK, Steiner RA (1992). Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology.* pp 958-963.
- Buyse J, Janssen S, Geelissen S, Swennen Q, Kaiya H, Darras VM *et al* (2009). Ghrelin modulates fatty acid synthase and related transcription factor mRNA levels in a tissue-specific manner in neonatal broiler chicks. *Peptides.* pp 1342-1347.

- Campbell RM, Lee Y, Rivier J, Heimer EP, Felix AM, Mowles TF (1991). GRF analogs and fragments: correlation between receptor binding, activity and structure. *Peptides*. pp 569-574.
- Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN *et al* (2002). Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 739-743.
- Carlini VP, Schiöth HB, deBarioglio SR (2007). Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 907-912.
- Carreira MC, Camiña JP, Smith RG, Casanueva FF (2004). Agonist-specific coupling of growth hormone secretagogue receptor type 1a to different intracellular signaling systems. Role of adenosine. *Neuroendocrinology*. pp 13-25.
- Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C (1997). Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology*. pp 2203-2206.
- Carro E, Senaris RM, Seoane LM, Frohman LA, Arimura A, Casanueva FF *et al* (1999). Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. *Neuroendocrinology*. pp 3-10.
- Carroll ME, France CP, Meisch RA (1979). Food deprivation increases oral and intravenous drug intake in rats. *Science*. pp 319-321.
- Casanueva FF (1992). Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am*. pp 483-517.
- Cattaneo L, De Gennaro Colonna V, Zoli M, Muller E, Cocchi D (1996). Characterization of the hypothalamo-pituitary-IGF-I axis in rats made obese by overfeeding. *J. Endocrinol*. pp 347-353.
- Ceda GP (1995). IGFs in the feedback control of GH secretion: Hypothalamic and/or pituitary action? *J. Endocrinol. Invest*. pp 734-737.
- Cella SG, Locatelli V, De Gennaro V, Pellini C, Pintor C, Muller EE (1986). In vivo studies with growth hormone (GH)-releasing factor and clonidine in rat pups: ontogenetic development of their effect on GH release and synthesis. *Endocrinology* **119**: 1164-1170.
- Cella SG, Locatelli V, De Gennaro V, Bondiolotti GP, Pintor C, Loche S *et al* (1988). Epinephrine mediates the growth hormone-releasing effect of galanin in infant rats. *Endocrinology* **122**: 855-859.
- Cella SG, Locatelli V, Mennini T, Zanini A, Bendotti C, Forloni GL *et al* (1990). Deprivation of growth hormone-releasing hormone early in the rat's neonatal life permanently affects somatotrophic function. *Endocrinology* **127**: 1625-1634.
- Chan YY, Clifton DK, Steiner RA (1996). Role of NPY neurones in GH-dependent feedback signalling to the brain. *Horm Res*. pp 12-14.
- Chanoine J-P, Wong ACK (2004). Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology*. pp 3813-3820.
- Chanoine J-P (2005). Ghrelin in growth and development. *Horm Res*. pp 129-138.

- Chapman IM, Pescovitz OH, Murphy G, Treep T, Cerchio KA, Krupa D *et al* (1997). Oral administration of growth hormone (GH) releasing peptide-mimetic MK-677 stimulates the GH/insulin-like growth factor-I axis in selected GH-deficient adults. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3455-3463.
- Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S *et al* (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 15247-15252.
- Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Goazigo ARL, Audinot V *et al* (2007). Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake";. *Science*. pp 766c-766c.
- Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J *et al* (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol*. pp 387-397.
- Cheek DB, Brayton JB, Scott RE (1974). Overnutrition, overgrowth and hormones (with special reference to the infant born of the diabetic mother). *Adv Exp Med Biol*. pp 47-72.
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H *et al* (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*. pp 97-102.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*. pp 4489-4492.
- Chihara K, Kato Y, Maeda K, Matsukura S, Imura H (1976). Suppression by cyproheptadine of human growth hormone and cortisol secretion during sleep. *J. Clin. Invest*. pp 1393-1402.
- Chihara K, Arimura A, Kubli-Garfias C, Schally AV (1979). Enhancement of immunoreactive somatostatin release into hypophysial portal blood by electrical stimulation of the preoptic area in the rat. *Endocrinology*. pp 1416-1418.
- Chihara K, Minamitani N, Kaji H, Arimura A, Fujita T (1981). Intraventricularly injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* **109**: 2279-2281.
- Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C *et al* (2003). The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* **144**: 754-759.
- Chow KBS, Sun J, Chu K-M, Cheung WT, Cheng CHK, Wise H (2011). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. pp 1-8.
- Chowen-Breed JA, Steiner RA, Clifton DK (1989). Sexual dimorphism and testosterone-dependent regulation of somatostatin gene expression in the periventricular nucleus of the rat brain. *Endocrinology*. pp 357-362.
- Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ *et al* (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Molecular Endocrinology*. pp 1600-1611.

- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. pp 427-429.
- Clark RG, Robinson IC (1985). Growth hormone responses to multiple injections of a fragment of human growth hormone-releasing factor in conscious male and female rats. *J. Endocrinol.* pp 281-289.
- Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC (1987). Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J. Endocrinol.* pp 399-407.
- Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC (1988). Growth hormone (GH) secretion in the conscious rat: negative feedback of GH on its own release. *J. Endocrinol.* pp 201-209.
- Clark RG, Carlsson LM, Trojnar J, Robinson IC (1989). The effects of a growth hormone-releasing Peptide and growth hormone-releasing factor in conscious and anaesthetized rats. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 249-255.
- Collin M, Backberg M, Ovesjo M-L, Fisone G, Edwards RH, Fujiyama F *et al* (2003). Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. *Eur J Neurosci*. pp 1265-1278.
- Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K (2003). Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas*. pp 161-166.
- Conlon JM (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides*. pp 269-278.
- Cordido F, Isidro ML, Nemina R, Sangiao-Alvarellos S (2009). Ghrelin and growth hormone secretagogues, physiological and pharmacological aspect. *Curr Drug Discov Technol*. pp 34-42.
- Costantini VJA, Vicentini E, Sabbatini FM, Valerio E, Lepore S, Tessari M *et al* (2011). GSK1614343, a Novel Ghrelin Receptor Antagonist, Produces an Unexpected Increase of Food Intake and Body Weight in Rodents and Dogs. *Neuroendocrinology*. pp 158-168.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL *et al* (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. pp 480-484.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL *et al* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**: 649-661.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**: 1714-1719.
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP *et al* (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* **346**: 1623-1630.
- Cummings DE (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*. pp 71-84.
- Cuttler L (1996). The regulation of growth hormone secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am*. pp 541-571.

- D'Alessio DA, Vogel R, Prigeon R, Laschansky E, Koerker D, Eng J *et al* (1996). Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J. Clin. Invest.* pp 133-138.
- D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ, Jr., Havel PJ (2001). Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1253-1259.
- D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR (2002). Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* **36**: 209-220.
- Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM *et al* (2001). Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*. pp 4244-4250.
- Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M *et al* (2004). Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology*. pp 2687-2695.
- Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L *et al* (2007). Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: Association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology*. pp 106-113.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T *et al* (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* **141**: 4255-4261.
- Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, Matsuo H *et al* (2002a). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**: 1120-1128.
- Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H *et al* (2002b). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. pp 124-129.
- Daughaday WH, Rotwein P (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Reviews*. pp 68-91.
- Davies L, Marks JL (1994). Role of hypothalamic neuropeptide Y gene expression in body weight regulation. *Am. J. Physiol.* pp R1687-1691.
- Day R, Dong W, Panetta R, Kraicer J, Greenwood MT, Patel YC (1995). Expression of mRNA for somatostatin receptor (sstr) types 2 and 5 in individual rat pituitary cells. A double labeling in situ hybridization analysis. *Endocrinology*. pp 5232-5235.
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE *et al* (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* **381**: 242-245.
- de Quidt ME, Emson PC (1986). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--I. Radioimmunoassay and chromatographic characterisation. *Neuroscience* **18**: 527-543.
- De Smet B (2005). Energy Homeostasis and Gastric Emptying in Ghrelin Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. pp 431-439.

- De Smet B, Thijs T, Peeters TL, Depoortere I (2007). Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterol Motil.* pp 211-217.
- De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C (2007). Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology.* pp 2355-2362.
- DelParigi A, Tschöp M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM *et al* (2002). High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 5461-5464.
- Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Bielanski W, Cieszkowski J, Dembinski M *et al* (2005). Variable effect of ghrelin administration on pancreatic development in young rats. Role of insulin-like growth factor-1. *J Physiol Pharmacol.* pp 555-570.
- DeNoto FM, Moore DD, Goodman HM (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* pp 3719-3730.
- Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H *et al* (2006). Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes.* pp 3486-3493.
- Di Luigi L, Conti FG, Casini A, Guidetti L, Zezze G, Pigozzi F *et al* (1997). Growth hormone and insulin-like growth factor I responses to moderate submaximal acute physical exercise in man: effects of octreotide, a somatostatin analogue, administration. *Int J Sports Med.* pp 257-263.
- Diéguez C, da Boit K, Novelle MG, Martínez de Morentin PB, Nogueiras R, López M (2010). New insights in ghrelin orexigenic effect. *Front Horm Res.* pp 196-205.
- Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R *et al* (2004). Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J. Clin. Invest.* pp 57-66.
- Do-Rego J-C, Leprince J, Chartrel N, Vaudry H, Costentin J (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides.* pp 2715-2721.
- Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A (1996). Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci.* pp 4468-4478.
- Doyon C, Drouin G, Trudeau VL, Moon TW (2001). Molecular evolution of leptin. *Gen Comp Endocrinol* **124**: 188-198.
- Drucker DJ, Asa S (1988). Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem.* pp 13475-13478.
- Dube D, Lissitzky JC, Leclerc R, Pelletier G (1978). Localization of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rat brain and pituitary. *Endocrinology.* pp 1283-1291.
- Dubrasquet M, Bataille D, Gespach C (1982). Oxyntomodulin (glucagon-37 or bioactive enteroglucagon): a potent inhibitor of pentagastrin-stimulated acid secretion in rats. *Biosci Rep.* pp 391-395.
- Eden S (1979). Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* pp 555-560.

- Edens A, Southard JN, Talamantes F (1994). Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology*. pp 2802-2805.
- Egecioglu E, Jerlhag E, Salomé N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-Y M *et al* (2010). Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addiction Biology*. pp 304-311.
- Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J (2002). Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* **146**: 241-244.
- Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R *et al* (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*. pp 283-291.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR *et al* (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* **21**: 1375-1385.
- Epelbaum J (1986). Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* **27**: 63-100.
- Epelbaum J (1992). Intrahypothalamic neurohormonal interactions in the control of growth hormone secretion. *Ciba Found Symp*. pp 54-64- discussion 64-58.
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* **381**: 415-421.
- Evans HM, Long JA (1922). Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 38-39.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* **385**: 165-168.
- Fan W, Ellacott KLJ, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD (2004). Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci*. pp 335-336.
- Farhy LS, Straume M, Johnson ML, Kovatchev B, Veldhuis JD (2002). Unequal autonegative feedback by GH models the sexual dimorphism in GH secretory dynamics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. pp R753-764.
- Farooqi IS, Yeo GS, O'Rahilly S (2003). Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med*. pp 606-609- author reply 606-609.
- Faulconbridge LF, Grill HJ, Kaplan JM, Daniels D (2008). Caudal brainstem delivery of ghrelin induces fos expression in the nucleus of the solitary tract, but not in the arcuate or paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Brain Res* **1218**: 151-157.
- Fekete C, Marks DL, Sarkar S, Emerson CH, Rand WM, Cone RD *et al* (2004). Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology*. pp 4816-4821.
- Feng DD, Yang SK, Loudes C, Simon A, Al-Sarraf T, Culler M *et al* (2011). Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *European Journal of Neuroscience*. pp 732-744.

- Ferland L, Labrie F, Jobin M, Arimura A, Schally AV (1976). Physiological role of somatostatin in the control of growth hormone and thyrotropin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **68**: 149-156.
- Fernandez-Vazquez G, Cacicedo L, Lorenzo MJ, Tolon R, Lopez J, Sanchez-Franco F (1995). Corticosterone modulates growth hormone-releasing factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology*. pp 31-35.
- Figlewicz DP (2003). Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. pp R882-892.
- Figlewicz DP, Bennett J, Evans SB, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC (2004). Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behav Neurosci*. pp 479-487.
- Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P (1981). The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *NSC*. pp 2173-2192.
- Flier JS (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. pp 337-350.
- Frantz AG, Rabkin MT (1964). Human growth hormone. clinical measurement, response to hypoglycemia and suppression by corticosteroids. *N Engl J Med*. pp 1375-1381.
- Frohman LA, Downs TR, Clarke IJ, Thomas GB (1990). Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep. Spontaneous secretion and response to insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Invest* **86**: 17-24.
- Fu L-Y, Acuna-Goycolea C, van den Pol AN (2004). Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J Neurosci*. pp 8741-8751.
- Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M (2003). Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol*. pp 227-240.
- Fukata J, Diamond DJ, Martin JB (1985). Effects of rat growth hormone (rGH)-releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinology*. pp 457-467.
- Fulton S, Woodside B, Shizgal P (2000). Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science*. pp 125-128.
- Funahashi H, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Ryushi T, Horie S *et al* (1999). The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*. pp 117-120.
- Ganzetti I, De Gennaro V, Redaelli M, Müller EE, Cocchi D (1986). Effect of hypophysectomy and growth hormone replacement on hypothalamic GHRH. *Peptides*. pp 1011-1014.
- Garofalo RS (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.* pp 156-162.
- Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen JAMJL, Broglio F, Ross RJM *et al* (2005). Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1055-1060.

- Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO (1993). Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. pp 77-84.
- Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Tolle V, Zizzari P *et al* (2009). Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. pp 413-419.
- Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Billard S, EPELBAUM J *et al* (2010). Ghrelin and Obestatin Circadian Levels Differentiate Bingeing-Purging from Restrictive Anorexia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3057-3062.
- Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR (1983). Molecular forms of human enteroglucagon in tissue and plasma: plasma responses to nutrient stimuli in health and in disorders of the upper gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 488-495.
- Ghigo E, Bellone J, Arvat E, Mazza E, Cellat SG, Brambilla F *et al* (1990a). Effects of alpha- and Beta-adrenergic agonists and antagonists on growth hormone secretion in man. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 473-476.
- Ghigo E, Goffi S, Nicolosi M, Arvat E, Valente F, Mazza E *et al* (1990b). Growth hormone (GH) responsiveness to combined administration of arginine and GH-releasing hormone does not vary with age in man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1481-1485.
- Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol*. pp 488-495.
- Giustina A, Wehrenberg WB (1994). Growth Hormone neuroregulation in diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab*. pp 73-78.
- Gluckman PD, Gunn AJ, Wray A, Cutfield WS, Chatelain PG, Guilbaud O *et al* (1992). Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. The International Board of the Kabi Pharmacia International Growth Study. *The Journal of Pediatrics*. pp 920-923.
- Goke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP (1995). Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci*. pp 2294-2300.
- Gomez S, Morel A, Nicolas P, Cohen P (1983). Regional distribution of the Mr 15,000 somatostatin precursor, somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat brain suggests a differential intracellular processing of the high molecular weight species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 297-305.
- Goodman RH, Aron DC, Roos BA (1983). Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J Biol Chem*. pp 5570-5573.
- Gouarderes C, Puget A, Zajac J-M (2004). Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF1 and NPFF2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains: a comparative autoradiographic study. *Synapse*. pp 249-269.
- Gourcerol G, Coskun T, Craft LS, Mayer JP, Heiman ML, Wang L *et al* (2007). Preproghrelin-derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean or obese rodents. *Obesity (Silver Spring)*. pp 2643-2652.

- Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V *et al* (2008). Obestatin Promotes Survival of Pancreatic β -Cells and Human Islets and Induces Expression of Genes Involved in the Regulation of β -Cell Mass and Function. *Diabetes*. pp 967-979.
- Grandt D, Schimiczek M, Struk K, Shively J, Eysselein VE, Goebell H *et al* (1994). Characterization of two forms of peptide YY, PYY(1-36) and PYY(3-36), in the rabbit. *Peptides*. pp 815-820.
- Greeley GHJ, Hashimoto T, Izukura M, Gomez G, Jeng J, Hill FL *et al* (1989). A comparison of intraduodenally and intracolonicly administered nutrients on the release of peptide-YY in the dog. *Endocrinology*. pp 1761-1765.
- Green H, Morikawa M, Nixon T (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*. pp 195-198.
- Grill HJ, Kaplan JM (2001). Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *Int J Obes Relat Metab Disord*. pp S73-77.
- Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology*. pp 239-246.
- Grilli R, Sibilia V, Torsello A, Pagani F, Guidi M, Luoni M *et al* (1996). Role of the neuronal histaminergic system in the regulation of somatotrophic function: comparison between the neonatal and the adult rat. *J Endocrinol* **151**: 195-201.
- Gualillo O, Lago F, Casanueva FF, Diéguez C (2006). One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*. pp 1-8.
- Guan J-L, Uehara K, Lu S, Wang Q-P, Funahashi H, Sakurai T *et al* (2002). Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. pp 1523-1532.
- Guerineau N, Drouhault R, Corcuff JB, Vacher AM, Vilayleck N, Mollard P (1990). Galanin evokes a cytosolic calcium bursting mode and hormone release in GH3/B6 pituitary cells. *FEBS Lett* **276**: 111-114.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*. pp 585-587.
- Guo F, Beaudet A, Tannenbaum GS (1996). The effect of hypophysectomy and growth hormone replacement on sst1 and sst2 somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acids in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **137**: 3928-3935.
- Guo ZF, Zheng X, Qin YW, Hu JQ, Chen SP, Zhang Z (2007). Circulating Preprandial Ghrelin to Obestatin Ratio Is Increased in Human Obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1875-1880.
- Gurriarán-Rodríguez U, Al-Massadi O, Roca-Rivada A, Crujeiras AB, Gallego R, Pardo M *et al* (2011). Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. pp 1927-1940.

- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z *et al* (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. pp 6320-6325.
- Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J *et al* (1999). Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol.* pp R1541-1544.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* pp 271-272.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D *et al* (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. pp 543-546.
- Han VK, Hynes MA, Jin C, Towle AC, Lauder JM, Lund PK (1986). Cellular localization of proglucagon/glucagon-like peptide I messenger RNAs in rat brain. *J. Neurosci. Res.* pp 97-107.
- Hansson C, Haage D, Taube M, Egecioglu E, Salomé N, Dickson SL (2011). Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. *NSC. IBRO*. pp 1-39.
- Harfstrand A, Fuxe K, Agnati LF, Eneroth P, Zini I, Zoli M *et al* (1986). Studies on neuropeptide Y-catecholamine interactions in the hypothalamus and in the forebrain of the male rat. Relationship to neuroendocrine function. *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL*. pp 355-376.
- Harvey S, Lea RW, Ahene C (1990). Central action of thyrotrophin-releasing hormone on growth hormone secretion in domestic fowl. *J. Endocrinol.* pp 83-88.
- Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M *et al* (2002). Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J. Endocrinol.* pp 239-245.
- Heijboer AC, van den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Pijl H *et al* (2006). Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. pp 732-738.
- Heinrichs SC, Richard D (1999). The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* **33**: 350-359.
- Herrington J, Hille B (1994). Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* **135**: 1100-1108.
- Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C (2000). The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*. pp 2585-2597.
- Herrington J, Carter-Su C (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* pp 252-257.
- Hewson AK, Dickson SL (2000). Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 1047-1049.
- Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter A-K *et al* (2003). Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 4258-4267.

- Hisano S, Daikoku S (1991). Existence of mutual synaptic relations between corticotropin-releasing factor-containing and somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Research*. pp 265-275.
- Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, van der Lely AJ, de Herder W, Lamberts SWJ (2005). Pre-clinical and clinical experiences with novel somatostatin ligands: advantages, disadvantages and new prospects. *J. Endocrinol. Invest.* pp 36-42.
- Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz TW (2005). Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Molecular Endocrinology*. pp 2400-2411.
- Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO *et al* (2006). GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology*.
- Horber FF, Haymond MW (1990). Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. *J. Clin. Invest.* pp 265-272.
- Horber FF, Marsh HM, Haymond MW (1991). Differential effects of prednisone and growth hormone on fuel metabolism and insulin antagonism in humans. *Diabetes*. pp 141-149.
- Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1992). Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology*. pp 2461-2467.
- Horvath TL, Naftolin F, Leranth C, Sahu A, Kalra SP (1996). Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interaction in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. pp 3069-3078.
- Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*. pp 283-286.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000). Ghrelin and Des-acyl Ghrelin: Two Major Forms of Rat Ghrelin Peptide in Gastrointestinal Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 909-913.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* **278**: 64-70.
- Hosoi T, Kawagishi T, Okuma Y, Tanaka J, Nomura Y (2002). Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology*. pp 3498-3504.
- Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K (2009). Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr. J.* pp 1119-1128.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI *et al* (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. pp 974-977.
- Hoyt EC, Lund PK, Winesett DE, Fuller CR, Ghatei MA, Bloom SR *et al* (1996). Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum. *Diabetes*. pp 434-439.

- Hulseley MG, Pless CM, White BD, Martin RJ (1995). ICV administration of anti-NPY antisense oligonucleotide: effects on feeding behavior, body weight, peptide content and peptide release. *Regulatory Peptides*. pp 207-214.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR *et al* (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**: 131-141.
- Imeryuz N, Yegen BC, Bozkurt A, Coskun T, Villanueva-Penacarrillo ML, Ulusoy NB (1997). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.* pp G920-927.
- Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT *et al* (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*. pp 2159-2168.
- Inoue Y, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N (2010). Transitional change in rat fetal cell proliferation in response to ghrelin and des-acyl ghrelin during the last stage of pregnancy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 455-460.
- Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*. pp 1237-1239.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J (1987). Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev* **8**: 426-438.
- Isgaard J, Carlsson L, Isaksson OG, Jansson JO (1988). Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology*. pp 2605-2610.
- Isidori A, Lo Monaco A, Cappa M (1981). A study of growth hormone release in man after oral administration of amino acids. *Curr Med Res Opin.* pp 475-481.
- Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR (1983). Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J. Clin. Invest.* pp 175-182.
- Jaffe CA, Ocampo-Lim B, Guo W, Krueger K, Sugahara I, DeMott-Friberg R *et al* (1998). Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J. Clin. Invest.* pp 153-164.
- Jansson JO, Ekberg S, Isaksson OG, Eden S (1984). Influence of gonadal steroids on age- and sex-related secretory patterns of growth hormone in the rat. *Endocrinology* **114**: 1287-1294.
- Jin SL, Han VK, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, Lund PK (1988). Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* pp 519-532.
- Kamegai J, Minami S, Sugihara H, Higuchi H, Wakabayashi I (1994). Growth hormone induces expression of the c-fos gene on hypothalamic neuropeptide-Y and somatostatin neurons in hypophysectomized rats. *Endocrinology* **135**: 2765-2771.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. pp 2438-2443.

- Kampe J, Wiedmer P, Pfluger PT, Castañeda TR, Burget L, Mondala H *et al* (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Research*. pp 133-149.
- Kanatani A, Ito J, Ishihara A, Iwaasa H, Fukuroda T, Fukami T *et al* (1998). NPY-induced feeding involves the action of a Y1-like receptor in rodents. *Regulatory Peptides*. pp 409-415.
- Kanatani A, Ishihara A, Iwaasa H, Nakamura K, Okamoto O, Hidaka M *et al* (2000). L-152,804: orally active and selective neuropeptide Y Y5 receptor antagonist. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 169-173.
- Kanse SM, Kreymann B, Ghatei MA, Bloom SR (1988). Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett*. pp 209-212.
- Katakami H, Arimura A, Frohman LA (1985). Hypothalamic somatostatin mediates the suppression of growth hormone secretion by centrally administered thyrotropin-releasing hormone in conscious rats. *Endocrinology*. pp 1139-1144.
- Katakami H, Downs TR, Frohman LA (1988). Inhibitory effect of hypothalamic medial preoptic area somatostatin on growth hormone-releasing factor in the rat. *Endocrinology*. pp 1103-1109.
- Kaufmann S, Jones KL, Wehrenberg WB, Culler FL (1988). Inhibition by prednisone of growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1258-1261.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H *et al* (2003). Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*. pp 2623-2633.
- Kawano H, Daikoku S (1988). Somatostatin-containing neuron systems in the rat hypothalamus: retrograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol*. pp 293-299.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior*. pp 773-795.
- Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG (2012). Apo-Ghrelin Receptor Forms Heteromers with DRD2 in Hypothalamic Neurons and Is Essential for Anorexigenic Effects of DRD2 Agonism. *Neuron*. Elsevier Inc. pp 317-332.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997). daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. pp 942-946.
- Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA *et al* (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med*. pp 741-745.
- Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Thornton J, Smith GP (1981). C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am. J. Clin. Nutr*. pp 154-160.
- Kitajima N, CHIHARA K, Abe H, Okimura Y, Fujii Y, Sato M *et al* (1989). Effects of dopamine on immunoreactive growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion from rat hypothalamic slices perfused in vitro. *Endocrinology*. pp 69-76.
- Knopf RF, Conn JW, Floyd JCJ, Fajans SS, Rull JA, Guntsche EM *et al* (1966). The normal endocrine response to ingestion of protein and infusions of amino acids. Sequential secretion of insulin and growth hormone. *Trans Assoc Am Physicians*. pp 312-321.

- Kohno D, Gao H-Z, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*. pp 948-956.
- Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T (2008). Ghrelin raises [Ca²⁺]_i via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 388-392.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. pp 656-660.
- Kojima M, Kangawa K (2010). Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp 140-148.
- Kokkotou E, Jeon JY, Wang X, Marino FE, Carlson M, Trombly DJ *et al* (2005). Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**: R117-124.
- Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE *et al* (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. pp 25196-25201.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F *et al* (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS ONE*. p e1797.
- Koo GC, Huang C, Camacho R, Trainor C, Blake JT, Sirotina-Meisher A *et al* (2001). Immune enhancing effect of a growth hormone secretagogue. *J Immunol*. pp 4195-4201.
- Kopchick JJ, Andry JM (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab*. pp 293-314.
- Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoer C, Swan DC, Mein CA *et al* (2002). A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 4005-4008.
- Kraicer J, Cowan JS, Sheppard MS, Lussier B, Moor BC (1986). Effect of somatostatin withdrawal and growth hormone (GH)-releasing factor on GH release in vitro: amount available for release after disinhibition. *Endocrinology*. pp 2047-2051.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS *et al* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**: 72-76.
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM (1968). Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*. pp 783-790.
- Krulich L, Mayfield MA, Steele MK, McMillen BA, McCann SM, Koenig JI (1982). Differential effects of pharmacological manipulations of central alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors on the secretion of thyrotropin and growth hormone in male rats. *Endocrinology*. pp 796-804.
- Kuhar MJ, Dall Vechia SE (1999). CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends in Neurosciences*. pp 316-320.

- Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M (1998). Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 15659-15664.
- Kwak SP, Young EA, Morano I, Watson SJ, Akil H (1992). Diurnal corticotropin-releasing hormone mRNA variation in the hypothalamus exhibits a rhythm distinct from that of plasma corticosterone. *Neuroendocrinology* **55**: 74-83.
- Lam KS, Lee MF, Tam SP, Srivastava G (1996). Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology*. pp 475-480.
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* **29**: 293-298.
- Larhammar D (1996). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*. pp 165-174.
- Laron Z, Frenkel J, Deghenghi R, Anin S, Klinger B, Silbergeld A (1995). Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children. *Clin Endocrinol*. pp 631-635.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Stidsen CE, Madsen K, Smith MS, Cameron JL (1999). Activation of central neuropeptide Y Y1 receptors potently stimulates food intake in male rhesus monkeys. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3781-3791.
- Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, Schoofs L, Luyten W (2006). Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 21-25.
- Lawton CL, Delargy HJ, Brockman J, Smith FC, Blundell JE (2000). The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *Br J Nutr*. pp 473-482.
- Le Dafniet M, Garnier P, Bression D, Brandi AM, Racadot J, Peillon F (1985). Correlative studies between the presence of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors and the in vitro stimulation of growth-hormone (GH) secretion in human GH-secreting adenomas. *Horm Metab Res*. pp 476-479.
- Le Quellec A, Kervran A, Blache P, Ciurana AJ, Bataille D (1992). Oxyntomodulin-like immunoreactivity: diurnal profile of a new potential enterogastrone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1405-1409.
- Le Roith D (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. pp 633-640.
- Le Roith D, Parrizas M, Blakesley VA (1997). The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging process. *Endocrine* **7**: 103-105.
- Leclerc R, Pelletier G, Puviani R, Arimura A, Schally AV (1976). Immunohistochemical localization of somatostatin in endocrine cells of the rat stomach. *Molecular and Cellular Endocrinology*. pp 257-261.
- Leonetti F, Silecchia G, Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Tiberti C *et al* (2003). Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 4227-4231.

- Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ *et al* (1987). Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. pp 537-543.
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*. pp 2521-2528.
- Levin F, Edholm T, Schmidt PT, Gryback P, Jacobsson H, Degerblad M *et al* (2006). Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3296-3302.
- Lewis UJ, Bonewald LF, Lewis LJ (1980). The 20,000-dalton variant of human growth hormone: location of the amino acid deletions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. pp 511-516.
- Li CH, Evans HM (1944). The isolation of pituitary growth hormone. *Science*. pp 183-184.
- Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL *et al* (2004). Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation*. pp 2221-2226.
- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA (1985). Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J. Clin. Invest.* pp 1144-1152.
- Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG (1992). Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature*. pp 765-768.
- Lin HD, Bollinger J, Ling N, Reichlin S (1984). Immunoreactive growth hormone-releasing factor in human stalk median eminence. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1197-1199.
- Ling N, Esch F, Bohlen P, Brazeau P, Wehrenberg WB, Guillemin R (1984). Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: growth hormone-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 4302-4306.
- Liposits Z, Merchenthaler I, Paull WK, Flerko B (1988). Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry*. pp 247-252.
- Liu J, Prudom CE, Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, Johnson ML *et al* (2008). Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1980-1987.
- Liu YL, Yakar S, Otero-Corchon V, Low MJ, Liu JL (2002). Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-I. *Molecular and Cellular Endocrinology*. pp 97-103.
- Lo C-M, Samuelson LC, Chambers JB, King A, Heiman J, Jandacek RJ *et al* (2008). Characterization of mice lacking the gene for cholecystokinin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. pp R803-810.
- Lobie PE, Breipohl W, Waters MJ (1990). Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* **126**: 299-306.

- Loeb JN (1976). Corticosteroids and growth. *N Engl J Med*. pp 547-552.
- Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y *et al* (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides*. pp 55-61.
- Low MJ, Otero-Corchon V, Parlow AF, Ramirez JL, Kumar U, Patel YC *et al* (2001). Somatostatin is required for masculinization of growth hormone-regulated hepatic gene expression but not of somatic growth. *J Clin Invest* **107**: 1571-1580.
- Lumb KJ, DeCarr LB, Milardo LF, Mays MR, Buckholz TM, Fisk SE *et al* (2007). Novel selective neuropeptide Y2 receptor PEGylated peptide agonists reduce food intake and body weight in mice. *J. Med. Chem.* pp 2264-2268.
- Lumpkin MD, Gegro-Vilar A, McCann SM (1981). Paradoxical elevation of growth hormone by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback. *Science*. pp 1072-1074.
- Lundberg JM, Tatemoto K, Terenius L, Hellström PM, Mutt V, Hokfelt T *et al* (1982). Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 4471-4475.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*. pp 683-685.
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S *et al* (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci*. pp 752-753.
- MacGregor DJ, Leng G (2005). Modelling the hypothalamic control of growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 788-803.
- Mackelvie KJ, Meneilly GS, Elahi D, Wong ACK, Barr SI, Chanoine J-P (2007). Regulation of appetite in lean and obese adolescents after exercise: role of acylated and desacyl ghrelin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 648-654.
- MacLeod JN, Pampori NA, Shapiro BH (1991). Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. *J. Endocrinol.* pp 395-399.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y *et al* (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. pp 1155-1161.
- Maiter D, Underwood LE, Maes M, Davenport ML, Ketelslegers JM (1988). Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. pp 1053-1059.
- Maiter D, Koenig JI, Kaplan LM (1991). Sexually dimorphic expression of the growth hormone-releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. *Endocrinology*. pp 1709-1716.
- Malozowski S, Hao EH, Ren SG, Marin G, Liu L, Southers JL *et al* (1991). Growth hormone (GH) responses to the hexapeptide GH-releasing peptide and GH-releasing hormone (GHRH) in the cynomolgus macaque: evidence for non-GHRH-mediated responses. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 314-317.

- Mannor DA, Winer LM, Shaw MA, Baumann G (1991). Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 30-34.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD (1998). Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* **4**: 718-721.
- Martin JB, Durand D, Gurd W, Faille G, Audet J, Brazeau P (1978). Neuropharmacological regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*. pp 106-113.
- Masuda A, Shibasaki T, Hotta M, Yamauchi N, Ling N, Demura H *et al* (1990). Insulin-induced hypoglycemia, L-dopa and arginine stimulate GH secretion through different mechanisms in man. *Regulatory Peptides*. pp 53-64.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z *et al* (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **276**: 905-908.
- Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC (2000). Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. pp R882-890.
- Mayo KE (1992). Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. pp 1734-1744.
- Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik DJ, Rahal JO (1995). Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog Horm Res*. pp 35-73.
- McCarthy GF, Beaudet A, Tannenbaum GS (1992). Colocalization of somatostatin receptors and growth hormone-releasing factor immunoreactivity in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*. pp 18-24.
- McDonald JK, Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM (1985). Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 561-564.
- Melen-Mucha G, Lawnicka H, Kierszniewska-Stepien D, Komorowski J, Stepien H (2006). The place of somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of the neuroendocrine glands tumors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. pp 237-254.
- Melville LD, Smith GP, Gibbs J (1992). Devazepide antagonizes the inhibitory effect of cholecystokinin on intake in sham-feeding rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. pp 975-977.
- Mendelson WB, Sitaram N, Wyatt RJ, Gillin JC, Jacobs LS (1978). Methoscopolamine inhibition of sleep-related growth hormone secretion. Evidence for a cholinergic secretory mechanism. *J. Clin. Invest*. pp 1683-1690.
- Menyhert J, Wittmann G, Lechan RM, Keller E, Liposits Z, Fekete C (2007). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology*. pp 4276-4281.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ *et al* (1996). Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 733-735.

- Mercer JG, Moar KM, Findlay PA, Hoggard N, Adam CL (1998a). Association of leptin receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 gene expression in the ovine and murine brainstem. *Regulatory Peptides*. pp 271-278.
- Mercer JG, Moar KM, Hoggard N (1998b). Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology*. pp 29-34.
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1993). Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol*. pp 711-769.
- Michel D, Lefevre G, Labrie F (1984). Dexamethasone is a potent stimulator of growth hormone-releasing factor-induced cyclic AMP accumulation in the adenohypophysis. *Life Sci*. pp 597-602.
- Miegunue P, St Pierre D, Broglio F, Cianflone K (2011). Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*. pp 704-714.
- Migrenne S, Le Foll C, Levin BE, Magnan C (2011). Brain lipid sensing and nervous control of energy balance. *Diabetes Metab*. pp 83-88.
- Miki N, Ono M, Shizume K (1984). Evidence that opiateergic and alpha-adrenergic mechanisms stimulate rat growth hormone release via growth hormone-releasing factor (GRF). *Endocrinology*. pp 1950-1952.
- Miki N, Ono M, Shizume K (1988). Withdrawal of endogenous somatostatin induces secretion of growth hormone-releasing factor in rats. *J Endocrinol* **117**: 245-252.
- Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF *et al* (2006). Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1491-1495.
- Miner JL, Della-Fera MA, Paterson JA, Baile CA (1989). Lateral cerebroventricular injection of neuropeptide Y stimulates feeding in sheep. *Am. J. Physiol*. pp R383-387.
- Miraglia del Giudice E, Santoro N, Cirillo G, Raimondo P, Grandone A, D'Aniello A *et al* (2004). Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. pp 447-450.
- Mitsugi N, Arita J, Kimura F (1990). Effects of intracerebroventricular administration of growth hormone-releasing factor and corticotropin-releasing factor on somatostatin secretion into rat hypophyseal portal blood. *Neuroendocrinology*. pp 93-96.
- Mizuno Y, Oomura Y (1984). Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Research*. pp 109-116.
- Moechars D, Depoortere I, Moreaux B, de Smet B, Goris I, Hoskens L *et al* (2006). Altered Gastrointestinal and Metabolic Function in the GPR39-Obestatin Receptor-Knockout Mouse. *Gastroenterology*. pp 1131-1141.
- Moller N, Jorgensen JO, Alberti KG, Flyvbjerg A, Schmitz O (1990). Short-term effects of growth hormone on fuel oxidation and regional substrate metabolism in normal man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1179-1186.

- Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, MAJ M (2008). Plasma Obestatin, Ghrelin, and Ghrelin/Obestatin Ratio Are Increased in Underweight Patients with Anorexia Nervosa But Not in Symptomatic Patients with Bulimia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 4418-4421.
- Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR (1986). Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Research*. pp 175-179.
- Morgan DG, Small CJ, Abusnana S, Turton M, Gunn I, Heath M *et al* (1998). The NPY Y1 receptor antagonist BIBP 3226 blocks NPY induced feeding via a non-specific mechanism. *Regulatory Peptides*. pp 377-382.
- Morley JE, Flood JF (1987). An investigation of tolerance to the actions of leptogenic and anorexigenic drugs in mice. *Life Sci*. pp 2157-2165.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. pp 289-295.
- Mounier F, Pellegrini E, Kordon C, EPELBAUM J, Bluet-Pajot MT (1997). Continuous intracerebroventricular administration of a corticotropin releasing hormone antagonist amplifies spontaneous growth hormone pulses in the rat. *J. Endocrinol*. pp 431-436.
- Muccioli G, Papotti M, Locatelli V, Ghigo E, Deghenghi R (2001). Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest* **24**: RC7-9.
- Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E (2004). Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*. pp 27-35.
- Muller E, Pecile A (1966). Influence of exogenous growth hormone on endogenous growth hormone release. *Proc Soc Exp Biol Med*. pp 1289-1291.
- Müller EE (1987). Neural control of somatotrophic function. *Physiol. Rev*. pp 962-1053.
- Müller EE, Cella SG, Parenti M, Deghenghi R, Locatelli V, De Gennaro Colonna V *et al* (1995). Somatotrophic dysregulation in old mammals. *Horm Res*. pp 39-45.
- Muller MB, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F, Wurst W (2000). Disruption of feeding behavior in CRH receptor 1-deficient mice is dependent on glucocorticoids. *Neuroreport* **11**: 1963-1966.
- Murakami Y, Kato Y, Kabayama Y, Inoue T, Koshiyama H, Imura H (1987). Involvement of hypothalamic growth hormone (GH)-releasing factor in GH secretion induced by intracerebroventricular injection of somatostatin in rats. *Endocrinology*. pp 311-316.
- Murao K, Sato M, Mizobuchi M, Nimi M, Ishida T, Takahara J (1994). Acute effects of hypoglycemia and hyperglycemia on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat. *Endocrinology*. pp 418-423.
- Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H *et al* (2002). Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* **277**: 5667-5674.
- Murray CDR, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA *et al* (2005). Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut*. pp 1693-1698.

- Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H *et al* (2001). Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**: R1483-1487.
- Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W *et al* (2004). Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation*. pp 3674-3679.
- Nagaya N, Kangawa K (2006). Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure. *Drugs*. pp 439-448.
- Nagy A (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**: 99-109.
- Naito N, Kawazoe I, Nakai Y, Kawauchi H (1988). Melanin-concentrating hormone-like immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. *Cell Tissue Res*. pp 291-295.
- Nakagawa K, Ishizuka T, Obara T, Matsubara M, Akikawa K (1987). Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)*. pp 165-171.
- Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y *et al* (2006). Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*. pp 1333-1342.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K *et al* (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. pp 194-198.
- Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS (2005). Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides*. pp 2274-2279.
- Näslund E, Gutniak M, Skogar S, Rossner S, Hellström PM (1998). Glucagon-like peptide 1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am. J. Clin. Nutr.* pp 525-530.
- Nass R, Farhy LS, Liu J, Prudom CE, Johnson ML, Veldhuis P *et al* (2008). Evidence for acyl-ghrelin modulation of growth hormone release in the fed state. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1988-1994.
- Negro-Vilar A, Ojeda SR, Advis JP, McCann SM (1979). Evidence for noradrenergic involvement in episodic prolactin and growth hormone release in ovariectomized rats. *Endocrinology*. pp 86-91.
- O'Carroll AM, Krempels K (1995). Widespread distribution of somatostatin receptor messenger ribonucleic acids in rat pituitary. *Endocrinology*. pp 5224-5227.
- O'Sullivan AJ, Kelly JJ, Hoffman DM, Freund J, Ho KK (1994). Body composition and energy expenditure in acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 381-386.
- Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L (2002a). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. pp 566-572.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L (2002b). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*. pp 271-275.

- Okada S, Kopchick JJ (2001). Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends Mol Med.* pp 126-132.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I *et al* (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* pp 135-138.
- Ono N, Lumpkin MD, Samson WK, McDonald JK, McCann SM (1984). Intrahypothalamic action of corticotrophin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. *Life Sci.* pp 1117-1123.
- Oomura Y, Nakamura T, Sugimori M, Yamada Y (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* **14**: 483-486.
- Oosterom J, Nijenhuis WA, Schaaper WM, Slootstra J, Meloen RH, Gispen WH *et al* (1999). Conformation of the core sequence in melanocortin peptides directs selectivity for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem.* pp 16853-16860.
- Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P, Molino F *et al* (2010). Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One* **5**: e9159.
- Ottlecz A, Samson WK, McCann SM (1986). Galanin: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone. *Peptides.* pp 51-53.
- Pacifico L, Anania C, Poggiogalle E, Osborn JF, Prossomariti G, Martino F *et al* (2009a). Relationships of acylated and des-acyl ghrelin levels to bone mineralization in obese children and adolescents. *Bone.* pp 274-279.
- Pacifico L, Poggiogalle E, Costantino F, Anania C, Ferraro F, Chiarelli F *et al* (2009b). Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* pp 861-870.
- Paik KH, Choe YH, Park WH, Oh YJ, Kim AH, Chu SH *et al* (2006). Suppression of acylated ghrelin during oral glucose tolerance test is correlated with whole-body insulin sensitivity in children with Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 1876-1881.
- Painson JC, Tannenbaum GS (1991). Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone-releasing factor signaling in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* pp 2858-2866.
- Park WH, Oh YJ, Kim GY, Kim SE, Paik KH, Han SJ *et al* (2006). Obestatin Is Not Elevated or Correlated with Insulin in Children with Prader-Willi Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 229-234.
- Parmar RM, Chan WW, Dashkevicz M, Hayes EC, Rohrer SP, Smith RG *et al* (1999). Nonpeptidyl somatostatin agonists demonstrate that sst2 and sst5 inhibit stimulated growth hormone secretion from rat anterior pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* pp 276-280.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995). The somatostatin receptor family. *Life Sci.* pp 1249-1265.

- Patel YC (1997). Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J. Endocrinol. Invest.* pp 348-367.
- Patterson M (2005). Characterization of Ghrelin-Like Immunoreactivity in Human Plasma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 2205-2211.
- Pedrazzini T, Seydoux J, Kunstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F *et al* (1998). Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med.* pp 722-726.
- Pelletier G, Leclerc R, Dube D, Labrie F, Puviani R, Arimura A *et al* (1975). Localization of growth hormone-release-inhibiting hormone (somatostatin) in the rat brain. *Am J Anat.* pp 397-401.
- Pelletier G, Dube D (1977). Electron microscopic immunohistochemical localization of alpha-msh in the rat brain. *Am J Anat.* pp 201-205.
- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA *et al* (2010). Ghrelin Increases the Rewarding Value of High-Fat Diet in an Orexin-Dependent Manner. *BPS. Society of Biological Psychiatry.* pp 1-7.
- Piao H, Hosoda H, Kangawa K, Murata T, Narita K, Higuchi T (2008). Ghrelin stimulates milk intake by affecting adult type feeding behaviour in postnatal rats. *Journal of Neuroendocrinology.* pp 330-334.
- Plotsky PM, Vale W (1985). Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science.* pp 461-463.
- Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A (1980). N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* pp 55-58.
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* pp 2924-2929.
- Pringle PJ, Di Silvio L, Hindmarsh PC, Matthews DR, Kurtz AB, Brook CG (1992). Analysis of trough serum growth hormone concentrations: comparison of an immunoradiometric assay and a sensitive ELISA for growth hormone. *Clin Endocrinol.* pp 169-174.
- Qader SS, Lundquist I, Ekelund M, Håkanson R, Salehi A (2005). Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regulatory Peptides.* pp 51-56.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ *et al* (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**: 243-247.
- Quillan JM, Sadee W, Wei ET, Jimenez C, Ji L, Chang JK (1998). A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH₂ fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. *FEBS Lett.* pp 59-62.
- Rehfeld JF, Sun G, Christensen T, Hillingso JG (2001). The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 251-258.

- Reimer MK, Pacini G, Ahren B (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*. pp 916-921.
- Reisine T, Bell GI (1995). Molecular properties of somatostatin receptors. *NSC*. pp 777-790.
- Ren A-J, Guo Z-F, Wang Y-K, Lin L, Zheng X, Yuan W-J (2009). Obestatin, obesity and diabetes. *Peptides*. pp 439-444.
- Rettori V, Milenkovic L, Aguila MC, McCann SM (1990). Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge. *Endocrinology*. pp 2296-2301.
- Richard D, Huang Q, Timofeeva E (2000). The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. pp S36-39.
- Rivier C, Brown M, Vale W (1977). Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate on the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. *Endocrinology* **100**: 751-754.
- Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Gil MJ, Becerril S, Sainz N *et al* (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. pp 541-552.
- Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Becerril S, Sainz N, Gil MJ *et al* (2010). Association of plasma acylated ghrelin with blood pressure and left ventricular mass in patients with metabolic syndrome. *J Hypertens*. pp 560-567.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D *et al* (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*. pp 4428-4431.
- Saeed uz Zafar M, Mellinger RC, Fine G, Szabo M, Frohman LA (1979). Acromegaly associated with a bronchial carcinoid tumor: evidence for ectopic production of growth hormone-releasing activity. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 66-71.
- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* **435**: 26-40.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K *et al* (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. pp 531-536.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H *et al* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**: 573-585.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. pp 799-806.
- Sato M, Frohman LA (1993). Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology*. pp 793-799.
- Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori Y, Sugimoto H (2010). Identification and Characterization of Acyl-Protein Thioesterase 1/Lysophospholipase I As a Ghrelin Deacylation/Lysophospholipid

- Hydrolyzing Enzyme in Fetal Bovine Serum and Conditioned Medium. *Endocrinology*. pp 4765-4775.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, Howe PR, Bloom SR, Polak JM (1985). Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*. pp 138-153.
- Sayegh AI, Ritter RC (2003). Cholecystokinin activates specific enteric neurons in the rat small intestine. *Peptides*. pp 237-244.
- Scanlon MF, Issa BG, Dieguez C (1996). Regulation of growth hormone secretion. *Horm Res*. pp 149-154.
- Schindler M, Humphrey PP, Emson PC (1996). Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. pp 9-47.
- Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, Wyatt MA, Jarvie EM, Sellers LA *et al* (1998). Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *British Journal of Pharmacology*. pp 209-217.
- Schwartz GJ, Netterville LA, McHugh PR, Moran TH (1991a). Gastric loads potentiate inhibition of food intake produced by a cholecystokinin analogue. *Am. J. Physiol*. pp R1141-1146.
- Schwartz GJ, McHugh PR, Moran TH (1993). Gastric loads and cholecystokinin synergistically stimulate rat gastric vagal afferents. *Am. J. Physiol*. pp R872-876.
- Schwartz MW, Marks JL, Sipols AJ, Baskin DG, Woods SC, Kahn SE *et al* (1991b). Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology* **128**: 2645-2647.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest*. pp 1101-1106.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*. pp 661-671.
- Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA *et al* (1996). Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res*. pp 664-668.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G *et al* (1997). Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*. p 349.
- Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK (2007). \square Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*. p 298.
- Seim I, Walpole C, Amorim L, Josh P, Herington A, Chopin L (2011). The expanding roles of the ghrelin-gene derived peptide obestatin in health and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. pp 1-7.
- Senaris RM, Humphrey PP, Emson PC (1994). Distribution of somatostatin receptors 1, 2 and 3 mRNA in rat brain and pituitary. *Eur J Neurosci*. pp 1883-1896.

- Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, Teno N (2004). Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 1487-1494.
- Shibasaki T, Oda T, Imaki T, Ling N, Demura H (1993). Injection of anti-neuropeptide Y gamma-globulin into the hypothalamic paraventricular nucleus decreases food intake in rats. *Brain Research*. pp 313-316.
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H *et al* (2003). Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*. pp 774-778.
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K *et al* (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. pp 227-232.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1996). Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. pp 5159-5162.
- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL (1997). Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*. pp 593-602.
- Smart JL, Tolle V, Low MJ (2006). Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest* **116**: 495-505.
- Smith GP, Jerome C, Gibbs J (1981). Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. *Peptides* **2**: 409-411.
- Smith GP (1996). The direct and indirect controls of meal size. *Neurosci Biobehav Rev* **20**: 41-46.
- Smith RG, Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL *et al* (1999). Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm Res*. pp 1-8.
- Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, Nguyen T, Harris R, York D *et al* (2001). Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 1991-1998.
- Soliman EB, Hashizume T, Ohashi S, Kanematsu S (1995). The interactive effects of VIP, PHI, GHRH, and SRIF on the release of growth hormone from cultured adenohypophyseal cells in cattle. *Endocr. J.* pp 717-722.
- Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980). Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*. pp 1875-1879.
- Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros Á, Argente J (2004). Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *The Journal of Pediatrics*. pp 36-42.
- Soto JL, Castrillo JL, Dominguez F, Dieguez C (1995). Regulation of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 messenger ribonucleic acid levels by growth hormone-secretagogues in rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Endocrinology*. pp 3863-3870.

- Spencer SA, Hammonds RG, Henzel WJ, Rodriguez H, Waters MJ, Wood WI (1988). Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. Purification, characterization, and sequence. *J Biol Chem.* pp 7862-7867.
- Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B *et al* (2012). Ghrelin Regulates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Restricts Anxiety After Acute Stress. *BPS. Society of Biological Psychiatry.* pp 1-9.
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981). Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* pp 6517-6521.
- Spiess J, Rivier J, Vale W (1983). Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature.* pp 532-535.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides.* pp 1189-1192.
- Stanley BG, Ha LH, Spears LC, Dee MG, 2nd (1993). Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D,L-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Res* **613**: 88-95.
- Stanley BG, Willett VL, 3rd, Donias HW, Dee MG, 2nd, Duva MA (1996). Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *Am J Physiol* **270**: R443-449.
- Steinle NI (2005). Variants in the Ghrelin Gene Are Associated with Metabolic Syndrome in the Old Order Amish. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 6672-6677.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L *et al* (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature.* pp 530-532.
- Steyn FJ, Huang L, Ngo ST, Leong JW, Tan HY, Xie TY *et al* (2011). Development of a Method for the Determination of Pulsatile Growth Hormone Secretion in Mice. *Endocrinology.* pp 3165-3171.
- Stuber GD, Evans SB, Higgins MS, Pu Y, Figlewicz DP (2002). Food restriction modulates amphetamine-conditioned place preference and nucleus accumbens dopamine release in the rat. *Synapse.* pp 83-90.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology.* pp 7973-7981.
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* pp 4679-4684.
- Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism.* pp 379-386.
- Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG (2007). Characterization of Adult Ghrelin and Ghrelin Receptor Knockout Mice under Positive and Negative Energy Balance. *Endocrinology.* pp 843-850.

- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. pp 165-186.
- Szentirmai E, Krueger JM (2006). Central administration of neuropeptide Y induces wakefulness in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**: R473-480.
- Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schoffski P, Hecker H *et al* (2003). Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol*. pp 447-454.
- Takahashi S, Reddy SV, Dallas M, Devlin R, Chou JY, Roodman GD (1995). Development and characterization of a human marrow stromal cell line that enhances osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. pp 1441-1449.
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M *et al* (2000). Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4908-4911.
- Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC *et al* (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 7438-7443.
- Tamaki M, Sato M, Matsubara S, Wada Y, Takahara J (1996). Dexamethasone increases growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 475-480.
- Tannenbaum GS, Martin JB (1976). Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. pp 562-570.
- Tannenbaum GS (1980). Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology*. pp 2117-2120.
- Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI (1983). Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science*. pp 77-79.
- Tannenbaum GS, Ling N (1984). The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*. pp 1952-1957.
- Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD (1998). Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. pp 4420-4423.
- Tannenbaum GS (2003). Interrelationship between the Novel Peptide Ghrelin and Somatostatin/Growth Hormone-Releasing Hormone in Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion. *Endocrinology*. pp 967-974.
- Tanner JM, Whitehouse RH (1976). Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child*. pp 170-179.
- Tanner JW, Davis SK, McArthur NH, French JT, Welsh THJ (1990). Modulation of growth hormone (GH) secretion and GH mRNA levels by GH-releasing factor, somatostatin and secretagogues in cultured bovine adenohypophysial cells. *J. Endocrinol*. pp 109-115.

- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. pp 659-660.
- Thakore JH, Dinan TG (1994). Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids. *Life Sci*. pp 1083-1099.
- Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC *et al* (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* **145**: 234-242.
- Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997). Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology*. pp 5063-5066.
- Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, Rio MC, EPELBAUM J, Bluet-Pajot MT (2001). In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. pp 54-61.
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J *et al* (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* **143**: 1353-1361.
- Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot M-T, Frere D, Foulon C, Bossu C *et al* (2003). Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 109-116.
- Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A *et al* (2000). Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* **119**: 395-405.
- Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE *et al* (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*. pp 2145-2151.
- Torsello A, Scibona B, Leo G, Bresciani E, Avallone R, Bulgarelli I *et al* (2003). Ontogeny and tissue-specific regulation of ghrelin mRNA expression suggest that ghrelin is primarily involved in the control of extraendocrine functions in the rat. *Neuroendocrinology*. pp 91-99.
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M *et al* (2001). Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 1220-1225.
- Toth K, Laszlo K, Lukacs E, Lenard L (2009). Intraamygdaloid microinjection of acylated-ghrelin influences passive avoidance learning. *Behavioural Brain Research*. pp 308-311.
- Track NS (1980). The gastrointestinal endocrine system. *Can Med Assoc J*. pp 287-292.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. pp 908-913.
- Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R *et al* (2001a). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* **24**: RC19-21.
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML (2001b). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. pp 707-709.

- Tuominen JA, Ebeling P, Laquier FW, Heiman ML, Stephens T, Koivisto VA (1997). Serum leptin concentration and fuel homeostasis in healthy man. *Eur J Clin Invest*. pp 206-211.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K *et al* (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. pp 69-72.
- Tzanela M, Wagner C, Tannenbaum GS (1997). Recombinant human growth hormone-binding protein fails to enhance the in vivo bioactivity of human growth hormone in normal rats. *Endocrinology*. pp 5316-5324.
- Ueno N, Inui A, Iwamoto M, Kaga T, Asakawa A, Okita M *et al* (1999). Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology*. pp 1427-1432.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjöström L *et al* (2001). Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3996-3999.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankinen T, Tschöp M *et al* (2002). Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* **10**: 782-791.
- Vahl TP, Drazen DL, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC (2010). Meal-anticipatory glucagon-like peptide-1 secretion in rats. *Endocrinology* **151**: 569-575.
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P (2000). Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest*. pp 253-262.
- van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM *et al* (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology*. pp 1773-1785.
- van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews*. pp 426-457.
- van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR (1979). Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology*. pp 666-673.
- Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Holtt V (1992). Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett*. pp 290-294.
- Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA *et al* (1995). Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 3209-3222.
- Venihaki M, Majzoub JA (1999). Animal models of CRH deficiency. *Front Neuroendocrinol*. pp 122-145.
- Verbaeys I, Tolle V, Swennen Q, Zizzari P, Buyse J, EPELBAUM J *et al* (2011). Scheduled feeding results in adipogenesis and increased acylated ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. pp E1103-1111.
- Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Näslund E, Beglinger C, Hellström PM *et al* (2001). A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. pp 4382-4389.

- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L *et al* (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.* p 19.
- Vestergaard ET, Djurhuus CB, Gjedsted J, Nielsen S, Moller N, Holst JJ *et al* (2008a). Acute effects of ghrelin administration on glucose and lipid metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* pp 438-444.
- Vestergaard ET, Gormsen LC, Jessen N, Lund S, Hansen TK, Moller N *et al* (2008b). Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes.* pp 3205-3210.
- Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G (2002). Neuroendocrine regulation of eating behavior. *J. Endocrinol. Invest.* pp 836-854.
- Vicennati V, Genghini S, De lasio R, Pasqui F, Pagotto U, Pasquali R (2007). Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *European Journal of Endocrinology.* pp 295-301.
- Wagner C, Caplan SR, Tannenbaum GS (1998). Genesis of the ultradian rhythm of GH secretion: a new model unifying experimental observations in rats. *Am J Physiol* **275**: E1046-1054.
- Wagner C, Caplan SR, Tannenbaum GS (2009). Interactions of ghrelin signaling pathways with the GH neuroendocrine axis: a new and experimentally tested model. *Journal of Molecular Endocrinology.* pp 105-119.
- Walker P, Dussault JH, Alvarado-Urbina G, Dupont A (1977). The development of the hypothalamo-pituitary axis in the neonatal rat: hypothalamic somatostatin and pituitary and serum growth hormone concentrations. *Endocrinology.* pp 782-787.
- Wank SA, Harkins R, Jensen RT, Shapira H, de Weerth A, Slattery T (1992). Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* pp 3125-3129.
- Waters MJ, Barnard RT, Lobie PE, Lim L, Hamlin G, Spencer SA *et al* (1990). Growth hormone receptors--their structure, location and role. *Acta Paediatr Scand Suppl* **366**: 60-72.
- Wehrenberg WB, Brazeau P, Luben R, Bohlen P, Guillemin R (1982). Inhibition of the pulsatile secretion of growth hormone by monoclonal antibodies to the hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinology.* pp 2147-2148.
- Wehrenberg WB, Bloch B, Phillips BJ (1984). Antibodies to growth hormone-releasing factor inhibit somatic growth. *Endocrinology.* pp 1218-1220.
- Wehrenberg WB, Baird A, Ying SY, Ling N (1985). The effects of testosterone and estrogen on the pituitary growth hormone response to growth hormone-releasing factor. *Biol Reprod.* pp 369-375.
- Wei L, Chan WW, Butler B, Cheng K (1993). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced desensitization on growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* pp 1396-1401.
- Weikel JC, Wichniak A, Ising M, Brunner H, Friess E, Held K *et al* (2003). Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E407-415.

- Wells JA (1996). Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 1-6.
- Whited KL, Thao D, Lloyd KCK, Kopin AS, Raybould HE (2006). Targeted disruption of the murine CCK1 receptor gene reduces intestinal lipid-induced feedback inhibition of gastric function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. pp G156-162.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides*. pp 63-69.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* **70**: 306-316.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, Harrold JA (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiology & Behavior*. pp 211-222.
- Williams KW, Elmquist JK (2011). Lighting up the hypothalamus: coordinated control of feeding behavior. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group. pp 277-278.
- Willoughby JO, Menadue M, Zeegers P, Wise PH, Oliver JR (1980). Effects of human growth hormone on the secretion of rat growth hormone. *J. Endocrinol*. pp 165-169.
- Willoughby JO, Brogan M, Kapoor R (1989). Intrahypothalamic actions of somatostatin and growth hormone releasing factor on growth hormone secretion. *Neuroendocrinology*. pp 592-596.
- Winer LM, Shaw MA, Baumann G (1990). Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **70**: 1678-1686.
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO (1997). Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. *Acta Paediatr Suppl*. pp 39-45.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**: 503-505.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R *et al* (2004). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pp 8227-8232.
- Wortley KE, del Rincon J-P, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO *et al* (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J. Clin. Invest*. pp 3573-3578.
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA *et al* (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* **50**: 2540-2547.
- Wren AM, Small CJ, Fribbens CV, Neary NM, Ward HL, Seal LJ *et al* (2002). The hypothalamic mechanisms of the hypophysiostrophic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* **76**: 316-324.
- Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD (2009). Loss of GABAergic Signaling by AgRP Neurons to the Parabrachial Nucleus Leads to Starvation. *Cell*. Elsevier Ltd. pp 1225-1234.
- Yamamoto D, IKESHITA N, DAITO R, HERNINGTYAS E, TODA K, TAKAHASHI K *et al* (2007). Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regulatory Peptides*. pp 141-144.

- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008). Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*. pp 387-396.
- Yanik T, Dominguez G, Kuhar MJ, Del Giudice EM, Loh YP (2006). The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans. *Endocrinology*. pp 39-43.
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*. pp 1066-1070.
- Ye P, Umayahara Y, Ritter D, Bunting T, Auman H, Rotwein P *et al* (1997). Regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in brain of transgenic mice expressing an IGF-I-luciferase fusion gene. *Endocrinology*. pp 5466-5475.
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* **20**: 111-112.
- Yi C-X, Heppner KM, Kirchner H, Tong J, Bielohuby M, Gaylinn BD *et al* (2012). The GOAT-Ghrelin System Is Not Essential for Hypoglycemia Prevention during Prolonged Calorie Restriction. *PLoS ONE*. p e32100.
- Zamrazilova H, Hainer V, Sedlackova D, Papezova H, Kunesova M, Bellisle F *et al* (2008). Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiol Res*. pp S49-55.
- Zhan X, Giorgianni F, Desiderio DM (2005). Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. *Proteomics*. pp 1228-1241.
- Zhang J, Obal F, Jr., Zheng T, Fang J, Taishi P, Krueger JM (1999). Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J Neurosci* **19**: 2187-2194.
- Zhang JV (2005). Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science*. pp 996-999.
- Zhang W, Chai B, Li J-y, Wang H, Mulholland MW (2008). Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. pp 4710-4716.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. pp 425-432.
- Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ *et al* (2010). From the Cover: Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. pp 7467-7472.
- Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE *et al* (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest*. pp 3564-3572.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*. pp 528-548.
- Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD *et al* (2005). Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology*. pp 3836-3842.

- Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot M-T (2007). Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*. pp 1648-1653.
- Zizzari P, Hassouna R, Longchamps R, EPELBAUM J, Tolle V (2011). Meal Anticipatory Rise in Acylated Ghrelin at Dark Onset is Blunted After Long-Term Fasting in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*. pp 804-814.